



Aislamiento y caracterización de sustancias presentes en extractos de especies del género **Morrenia (Asclepiadaceas)**

Blanco, Manuel Carlos
1976

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

AI SLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SUSTANCIAS PRESENTES
EN EXTRACTOS DE ESPECIES DEL GENERO MORRENIA (ASCLEPIADACEAS)

MANUEL CARLOS BLANCO

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Química
(Orientación Química Orgánica)

1976

A Mariana y Mirtha.

A mis padres.

Agradezco al Dr. Venancio Deulofeu, quien con su empeño y dedicación constantes posibilitó la finalización de esta Tesis, y al Dr. Duilio Giacobello por las enseñanzas que de él he recibido.

Agradezco también a las personas que proveyeron el material vegetal, sin cuya colaboración no se hubiera podido realizar el presente trabajo: Sr. R.A. Giacobello, Formosa; Dr. A. Schultz, Estación Experimental del INTA, Colonia Benítez, Chaco; Ing. Agr. H.N. Benátene, Estación Experimental del INTA, Concordia, Entre Ríos; Dr. E.S. Delgado, Universidad Nacional de Salta; Dr. H.R. Juliani, Universidad Nacional de Córdoba.

Al Ing. Agr. Arturo Burkart, Instituto de Botánica "Darwinion", San Isidro, Prov. de Buenos Aires y al Dr. Teodoro Meyer, Instituto "Miguel Lillo", Universidad Nacional de Tucumán, por la clasificación de las muestras de vegetales recibidas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la Beca concedida.

Al Dr. J.M. Domínguez, Unidad de Metabolismo y Nutrición del Hospital Tornú, por la realización de los ensayos biológicos.

Al Sr. J.J. Ferrer por la realización de los espectros de masa.

A la Srta. S. Melo por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

A la Dra. Blanca B. de Deferrari por la realización de los análisis elementales.

Al Dr. O.S. Tombesi, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, por la colaboración prestada.

Al Dr. H. Budzikiewicz, Instituto de Química Orgánica de la Universidad de Colonia, Alemania, por la realización del espectro de

masa del trans-cinamato de germanicol.

Al Dr. R.J. Hamilton, Colegio Regional de Tecnología de Liverpool Inglaterra, y al Dr. J.A. Lamberton, CSIRO Melbourne, Australia, por las muestras de hidrocarburos.

Al Dr. A.G. González, Universidad de La Laguna, Tenerife, España por la muestra de acetato de germanicol enviada.

A mis compañeros, profesores y personal del Departamento de Química Orgánica, por su cordialidad y apoyo.

RESUMEN

El presente trabajo, comprende el estudio químico de los componentes aislados y caracterizados en Morrenia brachystephana Griseb. (Asclepiadácea), y su extensión al estudio de otras 5 especies del mismo género.

En el mismo se describen:

- I. La familia de las Asclepiadáceas incluyendo al género Morrenia, su abundancia y distribución geográfica y una enumeración de las sustancias aisladas de la familia registradas en la literatura, que en algunos casos se hallan concentradas en la misma.
- II. Los antecedentes sobre la acción biológica de M. brachystephana, "tasi", desde la pintoresca narración de Alcalde Espejo en 1871 hasta nuestros días, en que se corroboró la actividad mencionada mediante ensayos modernos con animales de laboratorio.
- III. Los alcanos de Asclepiadáceas, con una introducción en la que se indican las características de estos compuestos de interés quimiotaxonómico, su abundancia y variaciones estructurales, y el análisis comparativo de los resultados encontrados en las 6 especies de Morrenia estudiadas.
- IV. Los flavonoides, también de interés quimiotaxonómico, sus variaciones estructurales, interrelaciones y biosíntesis de los distintos tipos.
- V. El triterpeno germanicol, componente mayoritario de los extractos en éter de petróleo de las especies estudiadas, una revisión

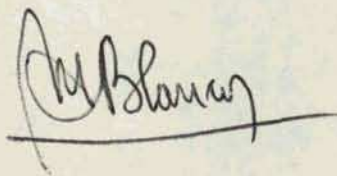
bibliográfica de su aislamiento de fuentes vegetales, su determinación estructural, transformaciones en medio ácido y biosíntesis de triterpenos pentacíclicos.

VI. La discusión de los resultados obtenidos, indicando como se efectuó la separación y determinación estructural de las sustancias halladas. Estudio de los espectros de resonancia magnética de hidrógeno y de masa del germanicol y derivados. Se analiza la distribución de los flavonoides en las especies de *Morrenia*, frente a posibles relaciones taxonómicas, y se indican otros flavonoides aislados de *Asclepiadáceas*. También se comenta la evolución de los flavonoides en plantas superiores.

VII. La Parte Experimental, en la que se detallan las técnicas empleadas y los procedimientos seguidos en el aislamiento y caracterización de los distintos compuestos en los extractos en éter de petróleo y metanol en *M. brachystephana*. Posteriormente se indican los datos obtenidos en la ampliación de este estudio a otras especies de *Morrenia*.

Finalmente en un Apéndice se dan los datos de recolección de cada una de las especies estudiadas.

Las referencias bibliográficas están ordenadas según orden alfabético del primer autor del trabajo y año del mismo, y aparecen al final de la Tesis.



INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
I. LAS ASCLEPIADACEAS	2
Distribución	3
El género <i>Morrenia</i>	4
Fitoquímica de las Asclepiadáceas	6
Terpenoides	7
Glicósidos	9
Alcaloides	13
II. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA <u>MORRENIA BRACHYSTEPHANA</u>	
Antecedentes	16
Ensayos biológicos actuales	19
III. ALCANOS DE ASCLEPIADACEAS	
Introducción	21
Composición química de las ceras	22
Los alcanos de las ceras	23
Biosíntesis	24
Hidrocarburos de Asclepiadáceas	24
Hidrocarburos de <i>Morrenias</i>	25
IV. LOS FLAVONOIDES	29
Biosíntesis de flavonoides	35
Conversión de calconas a flavonoides	39
Conversión de calconas a 3-hidroxi-flavanonas	42
3-Hidroxi-flavanonas como precursores de flavonoles y anto- cianidinas	46
Biosíntesis de antocianidinas y leucoantocianidinas	49
Biosíntesis de isoflavonoides	53
Biosíntesis de 3-arilcumarinas	57
Biosíntesis de rotenoides	60
Biosíntesis de auronas	61

V. EL TRITERPENO GERMANICOL	PAG.
Introducción	64
Aislamiento	66
Determinación estructural	67
Otros aspectos químicos del germanicol	73
Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos	76
VI. RESULTADOS OBTENIDOS	
A. Extracto en éter de petróleo	79
Espectros de RMP del germanicol y derivados	88
Espectros de masa del germanicol y sus ésteres	90
B. Extracto en metanol.	95
Flavonoides de Asclepiadáceas	98
Distribución general de los flavonoides	99
Conclusión	103
VII. PARTE EXPERIMENTAL	
Métodos empleados	109
Aplicación de métodos espectroscópicos para determinar la estructura de flavonoides	116
Método empleado para identificación de glicósidos flavonoides	121
Tratamiento del material vegetal	
A. <u>Morrenia brachystephana</u> Griseb.	123
Estudio del extracto en éter de petróleo	123
Estudio del extracto en metanol	140
Estudio del látex de frutos	155
B. <u>Morrenia conectens</u> Malme	156
C. <u>Morrenia odorata</u> (Hook. et Arn.) Lindley	159
D. Otras especies de Morrenia	161
APENDICE	166
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	168

INTRODUCCION

Esta Tesis consiste en un estudio químico parcial de seis especies del género *Morrenia* (Asclepiadáceas), que crecen en el territorio argentino.

Fue iniciada en base a que algunas de dichas especies producen efectos galactogogos, y se pudo confirmar, como se indica mas adelante, que la actividad biológica está localizada en el extracto acuoso.

Este trabajo contiene la parte inicial del estudio químico, que comprendió la separación de sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que se encuentran en la parte aérea de la planta. Se aislaron ceras y terpenoides, sustancias solubles en los extractos efectuados con éter de petróleo, y flavonoides, solubles en metanol.

Los flavonoides adquieren importancia, en parte por la utilización que se está haciendo de los mismos en estudios sistemáticos de vegetales.

I. LAS ASCLEPIADACEAS

Esta familia fue llamada así por Lindley en 1847, cambiando el nombre de Asclepiadeas que le había sido dado por R. Brown en 1809. El nombre deriva de Esculapio, Dios de la Medicina en la mitología griega (Meyer, 1944).

Son dicotiledóneas, que pertenecen al orden de las Gencianales. Según Melchior (1964), quien ha escrito en el manual de Engler el capítulo sobre Asclepiadáceas, la familia está representada por unos 250 géneros y 2000 especies, distribuidas principalmente en la zona tropical. Por su parte Good (1956), señala la existencia de unos 300 géneros representados por alrededor de 3500 especies, e indica que sólo una docena de otras familias, dentro de las dicotiledóneas gamopétalas, son tan amplias como esta.

La mayor parte de los autores dividen a las Asclepiadáceas en dos subfamilias: las Periplocoideas y las Asclepiadoideas, que se diferencian en sus mecanismos de floración. Las Asclepiadoideas, son las anteriormente denominadas Cinanchoideas por Schumann (1895).

Las Periplocoideas según Good (1956), son las menos diferenciadas, comprendiendo 41 géneros con aproximadamente 200 especies que se hallan confinadas en el Viejo Mundo, mientras que asigna a las Cinanchoideas (Asclepiadoideas), nombre todavía conservado por este autor, 250 géneros con mas de 3000 especies.

Melchior, indicó que la subfamilia de las Asclepiadoideas está

subdividida en 5 tribus: Asclepiadeas; Secamonias; Marsdenias (Tiloforeas); Ceropegias (Tiloforeas) y Gonolobeas, siendo las principales, las Asclepiadeas y las Tiloforeas con mas de 1500 especies cada una.

DISTRIBUCION

Las Asclepiadáceas, se hallan representadas en los cinco continentes, siendo Africa el mas rico en especies; en América existen aproximadamente un 10% de las mismas.

Schumann (1964) considera que el límite boreal de la distribución de esta familia, se halla en Europa, representado por Cynanchum vincetoxicum L., planta que crece en Alemania, Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia, hasta mas o menos los 61° de latitud norte, se introduce en Rusia, atraviesa los Montes Urales y avanza hasta el Altai (en la zona central de Asia).

En Africa, la familia se extiende por todo el Continente, y está representada por pocos géneros y especies en la parte norte, pero es abundante en el extremo sur. Para Schumann, la ciudad de El Cabo sería el centro de dispersión de la familia.

En Australia, ocurre todo lo contrario que en Africa; en el norte se han registrado 13 géneros, los cuales disminuyen hacia el sur.

En América del Norte, son frecuentes en Estados Unidos, disminuyendo su abundancia hacia las zonas frías, llegando hasta los 54 ° de latitud (Canadá).

En América del Sur, la familia es muy abundante en la parte norte

(Brasil), y va disminuyendo paulatinamente tanto en géneros como en especies a medida que avanza hacia el sur.

En la Argentina abundan, especialmente en las zonas llanas y boscosas del norte, centro y litoral. Las provincias fitogeográficas más ricas en Asclepiadáceas según Meyer (1944), son: el parque correntino-paraguayo, la selva tucumano-boliviana y el parque chaqueño. Un número reducido de especies llega a las altas montañas y a la Patagonia, donde la Aphanosthelma condolleanum se encuentra hasta los 50° de latitud sur, que es el límite austral de la familia en el mundo.

En total se encuentran 26 géneros (Meyer, 1944), de los cuales dos son endémicos, y están representados por 126 especies, siendo los géneros más comunes: Oxypetalum (28 especies); Cynanchum (11 especies) y Morrenia (8 especies).

EL GENERO MORRENIA

Está representado por 8 especies, todas las cuales crecen en la Argentina, y algunas se extienden a países limítrofes.

La distribución de las mismas en nuestro país es la siguiente:

1. Morrenia odorata (Hook. et Arn.) Lindley

Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos, San Juan, San Luis, Catamarca, La Rioja, Córdoba, Santiago del Estero, Tucumán, Salta, Jujuy, Santa Fe, Corrientes, Chaco y Formosa. Nombre vulgar: "tasi", "doca" (Es la más abundante en Argentina).

2. Morrenia brachystephana Griseb.

Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Catamarca, Tucumán, Entre Ríos y Corrientes. Nombre vulgar: "tasi".

3. Morrenia conectens Malme

Chaco, Formosa, Salta, Jujuy y Tucumán.

4. Morrenia herzogii Schlechter

Salta.

5. Morrenia stormiana (Morong) Malme

Chaco y Formosa.

6. Morrenia grandiflora Malme

Córdoba, Santiago del Estero, La Rioja, Salta y Formosa.

7. Morrenia stuckertiana (Kurtz ex Stuckert) Malme

Córdoba (especie endémica de esta provincia). Nombre vulgar: "tasi crespo", "tasi del zorro".

8. Morrenia schulziana Meyer

Chaco, Formosa y Santa Fe.

Con exclusión de las M. herzogii y M. grandiflora, se pudo obtener material de las especies mencionadas restantes, gracias a la ayuda prestada por las personas mencionadas al comienzo de esta Tesis.

FITOQUIMICA DE LAS ASCLEPIADACEAS

Esta familia se caracteriza por contener una variedad de compuestos orgánicos, cuya utilidad taxonómica, en muchos casos no es grande, por el número reducido de especies estudiadas, o por pertenecer a tipos químicos muy difundidos en las plantas superiores (por ejemplo: compuestos fenólicos simples, ácidos clorogénicos, hidratos de carbono, ciclitoles, flavonoides, ácidos grasos, fitosteroles como sitosterol, campesterol y stigmasterol). Por otra parte, otras sustancias de menor difusión se encuentran concentradas en esta familia.

La información que se detalla a continuación sobre los compuestos caracterizados, ha sido tomada de varias fuentes. En primer lugar, del trabajo de Abisch y Reichstein (1962) quienes hicieron un estudio analítico de 70 especies de Asclepiadáceas africanas; de la excelente revisión de Hegnauer (1964); de la compilación de Raffaui sobre alcaloides (1970), y de la serie de trabajos publicados por Mitsuhashi desde 1960 hasta el presente, sobre glicósidos del pregnano de Asclepiadáceas que crecen en Japón.

Se revisó además el Chemical Abstracts, y publicaciones específicas dedicadas a productos naturales (Phytochemistry; Lloydia; Planta Medica), cubriendo la literatura hasta los primeros meses de 1975.

El trabajo de Abisch y Reichstein (1962), merece una mención especial ya que por medio de reacciones específicas, estudiaron la presencia de diversas clases de compuestos en las 70 especies analizadas. De las mismas, 51 dieron positiva la reacción de 2-desoxiazúcares, los cuales son constituyentes de los glicósidos de tipo cardenolido y del

pregnano que se encuentran en estas plantas.

Sólo 4 especies dieron reacción de alcaloides, lo cual resulta una diferenciación interesante de las Apocináceas, familia vinculada a ésta, en la cual el número de alcaloides aislados es grande.

La presencia de cardenolidos, se confirmó porque 36 de ellas dieron reacción positiva de Kedde, característica de los mismos.

La reacción de Liebermann-Burchard, para triterpenos y esteroides, sólo fue positiva en 23 especies, cantidad algo menor de las que dieron reacción de Kedde positiva.

Utilizando los datos de los trabajos anteriores, se han de mencionar los grupos de compuestos que tienen interés desde el punto de vista fitoquímico.

TERPENOIDES

Triterpenos. Los representantes de este grupo, aislados de Asclepiadáceas, son también comunes a otras familias de plantas superiores, salvo algunos casos del grupo del oleanano (olean-12-eno polihidroxiados), y se los halló libres o esterificados con diversos ácidos orgánicos.

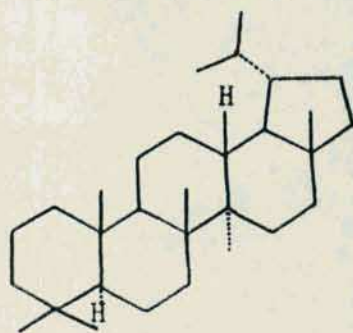
Los principales compuestos aislados son los siguientes (se mencionarán algunos casos concretos de aislamiento):

Grupo del lupano (cuya estructura corresponde a la fórmula (1)

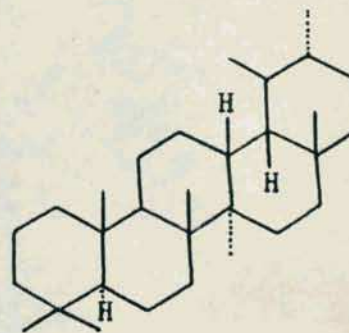
- Lupeol, acetato e isovalerianato (Reichstein et.al., 1967).

Grupo del ursano (fórmula 2)

- α -amirina (Rama Murti y Seshadri, 1941); acetato (Berl y Sharma, 1963)
- Taraxasterol, acetato e isovalerianato (Hesse et. al., 1941).
- Acido ursólico (White y Senti, 1945).



(1)



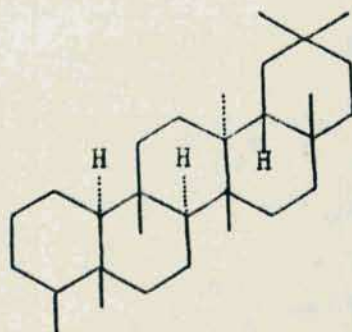
(2)

Grupo del friedelano (fórmula 3)

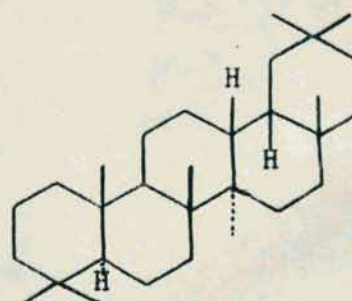
- Friedelina (Torrance y Marais, 1963).

Grupo del oleanano (fórmula 4).

- β -amirina y su acetato (Sierp et.al., 1970; Domínguez et.al., 1972), acetato e isovalerianato (Reichstein et.al., 1967); trans-cinamato (Kern y Haselbeck, 1950); juarezato (Domínguez et.al., 1974).



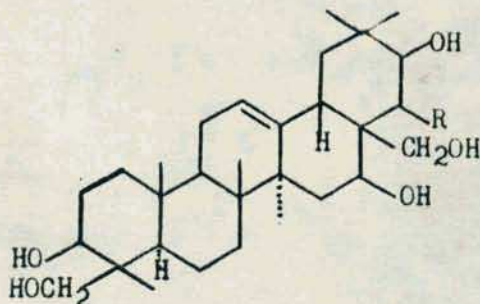
(3)



(4)

Merece señalarse que en algunos casos, se encontraron sustancias

polihidroxiladas del grupo del oleanano como la gimnestrogenina (5) (Stöcklin, 1968) y la gimnemagenina (6) (Stöcklin, 1969).



R:

(5) -H

(6) -OH

Otros compuestos de este grupo, no fueron identificados definitivamente, como el α y β -calotropeol (Rama Murti y Seshadri, 1943), y el morrenol (de M. brachystephana, Arata y Gelzer, 1891).

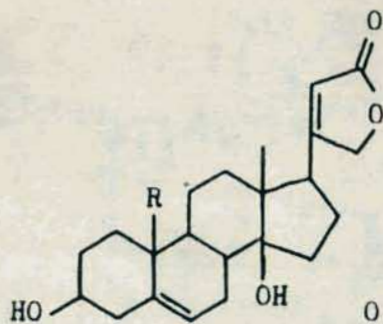
GLICOSIDOS

Cardenolidos. Estos compuestos fueron aislados con frecuencia de las Asclepiadáceas. En cierta forma, son compuestos característicos de esta familia.

Las agliconas de estos glicósidos poseen un esqueleto carbonado de tipo esteroide. Considerando los que poseen una estereoquímica relacionada, la diferencia entre los mismos consiste en distintas etapas de oxidación determinada por grupos hidroxilos y a veces un grupo aldehído.

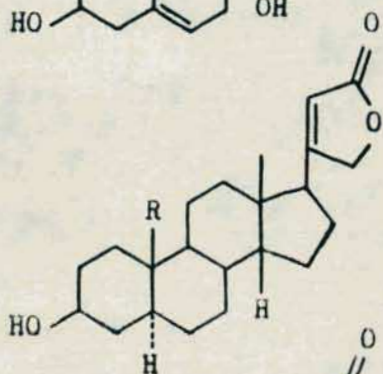
Todas tienen una cadena lateral formada por una lactona de 4 átomos de carbono, α - β no saturada, que definen a estas sustancias.

Algunos de los grupos estereoquímicos de estas agliconas se indican a continuación:

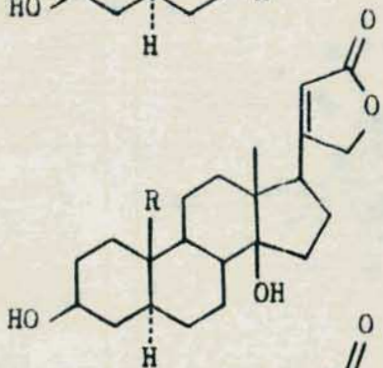


R:

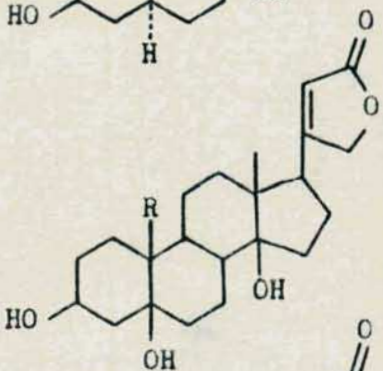
- (7) a $-\text{CH}_3$ xismalogenina (Reichstein et. al., 1967)
 b $-\text{CH}_2\text{OH}$ pachigenol (Schmid et. al., 1959)
 c $-\text{CHO}$ pachigenina (Fieser et. al., 1960)



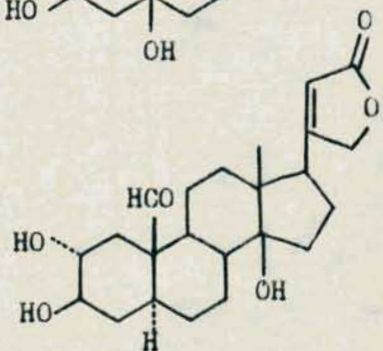
- (8) a $-\text{CH}_3$ 3-epi-digitoxigenina
 b $-\text{CH}_2\text{OH}$ carpogenol (Schmid et. al., 1959)
 c $-\text{CHO}$ carpogenina (Göschke et. al., 1961)



- (9) a $-\text{CH}_3$ uzarigenina (Elber et. al., 1969)
 b $-\text{CH}_2\text{OH}$ coroglaucigenina (Sierp et. al., 1970)
 c $-\text{CHO}$ corotoxigenina (id.)



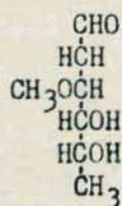
- (10) a $-\text{CH}_3$ periplogenina (Reichstein et. al., 1967)
 b $-\text{CHO}$ strofantidina (id.)



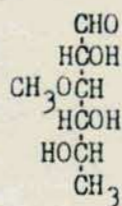
- (11) calotropagenina (asclepogenina)
 (Hassal y Reyle, 1956, 1959)

Los azúcares, como ocurre en la mayor parte de los glicósidos, están siempre unidos al hidroxilo de C-3, y su complejidad varía, desde monosacáridos hasta oligosacáridos.

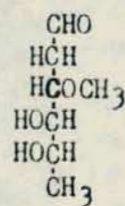
Es interesante señalar, que mientras en algunos glicósidos se encuentran solamente D-glucosa y L-ramnosa, en otros casos están acompañados por desoxiazúcares de 6 átomos de carbono, de distribución mas restringida. Para todos ellos la unión glicosídica es generalmente β . Los mas frecuentes son:



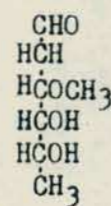
D-tevetosa



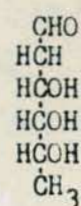
L-digitalosa



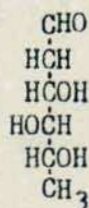
L-oleandrosa



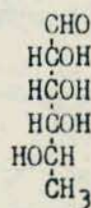
D-cimarosa



D-digitoxosa

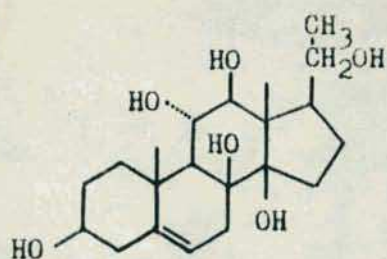


D-boivínosa

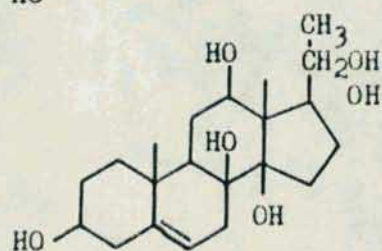


L-talometilosa

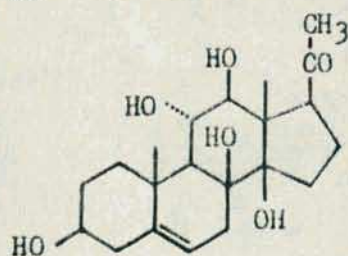
b- Glicósidos de pregnano. Otro tipo de compuestos aislados de esta familia, en proporción apreciable, son glicósidos cuyo esqueleto básico es un pregnano. Son sustancias que en solución acuosa tienen gusto amargo. Algunas de las agliconas encontradas son:



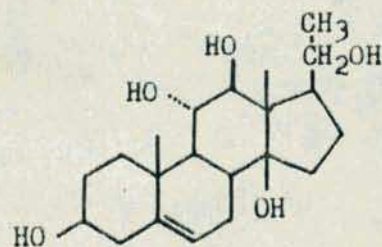
(12) 17- β -marsdenina (Saner et.al., 1970)



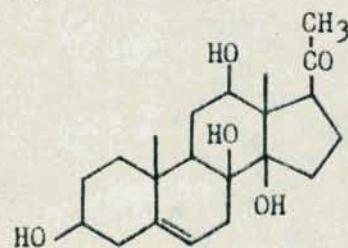
(13) sarcostina (Jäggi et.al., 1967)



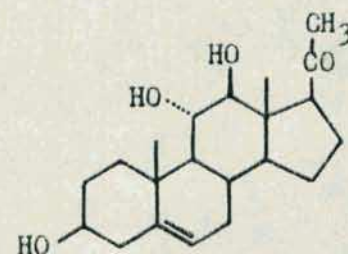
(14) marsectohexol (Saner et.al., 1970)



(15) drevogenina D (Bhatnagar et.al., 1968)



(16) lineolona (Jäggi et.al., 1967)



(17) drevogenina P (Saner et.al., 1970)

En estos glicósidos se encuentran monosacáridos que coinciden con los hallados en los glicósidos cardenolidos, siendo además frecuente la xilosa y habiéndose hallado pocos casos con ramnosa.

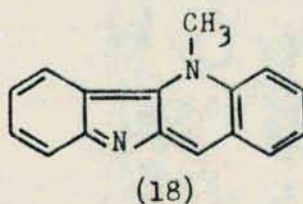
Además los glicósidos del pregnano, suelen estar esterificados en los hidroxilos de la aglicona, con distintos ácidos orgánicos. Se han caracterizado principalmente: ácido benzoico, ácido cinámico, ácido isovalérico, ácido α -hidroxivalérico, ácido tíglico (2-metil-2-trans-butenoico), ácido angélico (2-metil-2-cis-butenoico), ácido β, β -dimetil acrílico. (Hegnauer, 1964).

ALCALOIDES

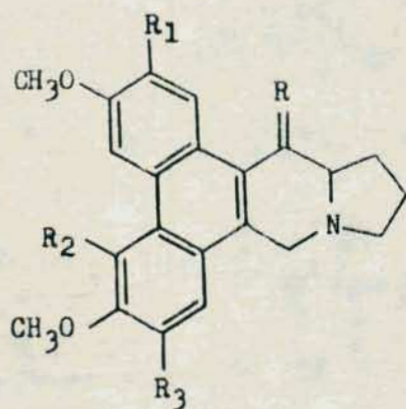
La proporción de especies de Asclepiadáceas, en las cuales se han encontrado alcaloides, es baja, como ya fue mencionado. Es interesante señalar, que en algunas especies se han aislado bases muy simples y relativamente difundidas, como la β -fenil etilamina (Kamienksy, 1957), nicotina (Marion, 1939) y otras comunes como coniina (Klein, 1931).

Otras bases encontradas en Asclepiadáceas son de tipos químicos más complejos y de poca distribución en el Reino Vegetal, y son prácticamente representativas de la familia.

Una de ellas es la criptolepina (18), (Gellert et.al., 1951), un producto tetracíclico lineal, parte del cual es un núcleo indólico.

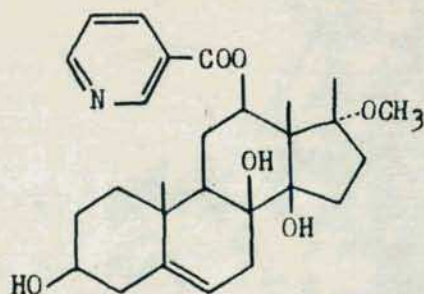


Además se aislaron un número de sustancias, cuyo esqueleto es del tipo fenantroindolizidina. Como ejemplo de este grupo, pueden citarse los alcaloides aislados de Tiloforeas: tilofoforina (Govindachari, 1960a), tilofoforinina (Govindachari *et.al.*, 1960 b), tilocrebina (Gellert *et.al.* 1962) y antofina (Wiegrebe *et.al.*, 1969).

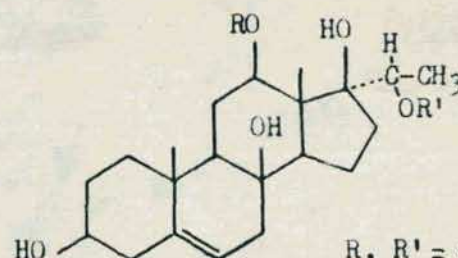


- | | |
|---------------------|---|
| (19) tilofoforina | $\begin{cases} R = -H_2 \\ R_1 = R_3 = -OCH_3 \\ R_2 = -H \end{cases}$ |
| (20) tilofoforinina | $\begin{cases} R = -H, -OH \\ R_1 = R_2 = -H \\ R_3 = -OCH_3 \end{cases}$ |
| (21) tilocrebina | $\begin{cases} R = -H_2 \\ R_3 = -H \\ R_1 = R_2 = -OCH_3 \end{cases}$ |
| (22) antofina | $\begin{cases} R = -H_2 \\ R_1 = -OCH_3 \\ R_2 = R_3 = -H \end{cases}$ |

Gellert y Summons (1973) encontraron alcaloides vinculados a pregnanos polihidroxilados, de tipo similar a los hallados como glicósidos, los cuales estaban esterificados con el ácido nicotínico. Estos son rostratamina (23) y rostratina (24).



(23)



(24)

R, R' = acetyl,
nicotinoil

Al comentar los compuestos aislados de las Morrenias, estudiadas por nosotros, se considerará la relación que tienen estos con los productos aislados de otras especies de esta familia, en particular, en relación a posibles correlaciones quimiotaxonómicas.

II. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA MORRENIA BRACHYSTEPHANA

ANTECEDENTES

La primera noticia que hemos encontrado, sobre la actividad galactogoga de M. brachystephana Griseb., ha sido en un artículo publicado por Alcalde Espejo (1871), en el cual menciona una serie de datos interesantes sobre esta planta, cuyo nombre vulgar es tasí o tasis.

En dicho artículo, Espejo describió una anécdota, bajo el título "Una excursión por la sierra de Córdoba", refiriéndose a las propiedades del tasí; en él menciona textualmente:

"Dicen que vuelve la leche a la mujer, aun cuando hayan trans-"
"currido 8 ó 10 años que dejó de criar. Mi duda al aserto de "
"tal fenómeno, hirió el amor propio de quien lo refería, y tra-"
"jo a mi presencia en una casa de la Pedanía de la Argentina "
"a María Sosa de raza india, mujer de unos 40 años acompañando-"
"la su sobrina Elisa Sosa de 16 años. Refirió la primera que "
"muerta su hermana a poco de nacer la criatura, y careciendo de "
"medios para criarla, le aconsejaron tomar agua de la infusión "
"de la raíz de tasí, que siempre que tenía sed y aun cuando no "
"la tuviese bebía aquella infusión y que a los pocos días tuvo "
"leche abundante para criar a su sobrina tan saludable y robus-"
"ta como estaba a la vista. Añadió que hacía justo 15 años que "
"había dejado de criar."

Espejo también indicó que el tasí (palabra que acentúa en la últi-

ma sílaba), "sirve para cuajar la leche, y los filamentos sedosos que encierra la baya, se los usa como yesca para sacar fuego."

Tanto la acción galactogoga, como los últimos empleos del tasi, fueron mencionados por Hieronymus (1882), quien indicó además, que según Lorentz los indios de Salta y Santiago del Estero, utilizaban los frutos no maduros de las dos especies conocidas en esa época (M. brachystephana y M. odorata), para comerlos crudos, asados o elaborar dulces.

Esta información, ya era conocida en Buenos Aires, y llamó la atención de Ortiz, pues en 1880, éste presentó una Tesis en la Facultad de Medicina, titulada "Las mamas y el tasi argentino". En la misma luego de referir las características botánicas de ambas especies, antes mencionadas, hizo un breve análisis químico del látex e indicó la acción galactogoga de las infusiones.

Arata y Gelzer (1891 a), quienes citaron las referencias folklóricas de Espejo, y las comentaron en forma risueña, efectuaron el primer estudio químico de la planta, que publicaron en forma mas extensa en ese mismo año (1891 b).

De extractos acídicos, siguiendo los métodos conocidos en aquella época, pudieron aislar una sustancia que dio reacción positiva de alcaloides, y que denominaron morrenina, y que no pudieron caracterizar debido a la pequeña cantidad de que disponían.

De frutos de tasi desmenuzados, sacaron un jugo lechoso, del cual por tratamiento con alcohol caliente, extrajeron una sustancia poco polar que denominaron morrenol, que dio punto de fusión 168°, y cuyo aná-

lisis elemental dio un alto contenido de carbono y un bajo contenido de oxígeno, con una fórmula probable $C_{14}H_{22}O$. Según los autores, esta sustancia sería similar a la ascleniona, que posteriormente fue identificada como sitosterol.

Arata y Gelzer, en su publicación (1891 b), hicieron finalmente un resumen de las distintas propiedades terapéuticas de varias especies de Asclepiadáceas.

Basado en las informaciones de Ortiz, y en los estudios efectuados por Arata y Gelzer sobre el tasi, Del Arca (1892), analizó los resultados obtenidos de la administración de infusiones de frutos, raíces u hojas, a un grupo de 15 mujeres jóvenes, en las cuales se había producido la agalactia (desaparición de la leche materna), dentro de los 20-120 días posteriores al parto. Obtuvo resultados favorables en 11 casos, en dos fueron dudosos y en otros dos fueron negativos.

Sicardi, un discípulo de Del Arca, profundizó el estudio iniciado por éste, y en su trabajo de Tesis (1892) presentó nuevas experiencias en seres humanos, que mostraron la actividad de esta planta.

En el mismo año, 1892, se creó la primera Comisión para establecer el Código Medicamentario Argentino, y en éste se incluyó el tasi y distintas recetas para su administración.

Paralelamente, la casa Merck de Darmstadt, envió a la Universidad de Erlangen una cantidad de tasi, cuyo estudio sirvió de trabajo de Tesis a Hantzschel (1895), la cual no pudo ser consultada.

Perrot y Chevalier (1910), quienes mencionaron los trabajos de Arata y Gelzer, confirmaron la presencia de un alcaloide tóxico en las

raíces, sin aislarlo.

Posteriormente, Chevalier y Goris (1910), estudiaron la composición química de la leche de mujeres jóvenes a las cuales se les había administrado infusiones de M. brachystephana y encontraron que los porcentajes de grasas, caseína y lactosa, se mantuvieron similares a los valores normales, con el tratamiento de tasi, al que calificaron de "galactógeno fisiológico."

J. A. Domínguez, en su publicación Datos para la Materia Médica Argentina, hizo un resumen de las observaciones efectuadas por la mayor parte de los autores anteriores e indicó que el tasi fue preconizado como galactógeno (1905).

Posteriormente a los trabajos mencionados, y hasta el comienzo de esta Tesis, no hemos encontrado ningún trabajo nuevo, sobre estudios químicos o biológicos con esta especie de Asclepiadácea.

ENSAYOS BIOLOGICOS ACTUALES

Con el concurso del Dr. J. M. Domínguez, del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Buenos Aires (1973), se realizaron una serie de experiencias con extractos acuosos de M. brachystephana, en conejas preñadas, según los métodos actuales para la investigación de actividad galactogénica, con el resultado de la aparición de un líquido con aspecto de leche en las glándulas mamarias, y con un porcentaje de lactosa (1,9 %) de acuerdo con la que contiene la leche de coneja. Los testigos dieron resultados negativos.

En la fotografía adjunta, pueden apreciarse las glándulas mamarias en una coneja a la que se administró extracto acuoso de M. brachystephana (a), junto a una hembra testigo (b), sacrificadas en el día vigésimo de su período de gestación.



(a)

(b)

Por otra parte, los Dres. Montuori y Ceñal (1974), efectuaron ensayos en ratas, según un método desarrollado por ellos, en el que se estudia el aumento de peso de las crías de 17 días de vida, que se separan de la madre, tratadas con extracto acuoso de M. brachystephana, durante 7 horas, y luego se las reúne con ella nuevamente por dos horas. El aumento de peso de las crías, en estas condiciones, fue superior a los testigos, de madres no tratadas con el extracto de tasi.

III. ALCANOS DE ASCLEPIADACEAS

INTRODUCCION

Los alcanos están ampliamente distribuidos en los Reinos Vegetal y Animal. En las plantas, son abundantes en las ceras de las cutículas, las cuales actúan entre otras funciones, como cubiertas protectoras de hojas y tallos.

La investigación química detallada de los variados constituyentes de esta cubierta protectora, fue relativamente mas lenta que la de otros productos de separación mas sencilla.

Una de las primeras contribuciones a su estudio, fue la de Chibnall y sus colaboradores, en el año 1934 (a, b), quienes emplearon el método clásico de cristalización fraccionada, y como criterio de pureza, los puntos de fusión y el espectro de difracción de rayos X de los cristales.

Su trabajo cuidadoso, demostró que muchos componentes "puros" aislados previamente por otros autores, eran en realidad mezclas.

Desde comienzos de la década del 60, con el desarrollo de las técnicas de cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masa, se ha facilitado el estudio de tales mezclas, y han comenzado a usarse como criterio taxonómico (p. ej. Purdie y Truter, 1961; Eglinton y Hamilton, 1967), en base a las siguientes consideraciones: a) facilidad para su extracción y análisis; b) la universalidad de su existencia; c) la variación de la composición observada para distintas especies y d)

la pérdida de variación estacional, debido probablemente a que las ceras son productos finales de las funciones metabólicas regulares de las plantas.

COMPOSICION QUIMICA DE LAS CERAS

Los estudios modernos revelaron que las ceras de hojas, son mezclas complejas de series homólogas de sustancias orgánicas de cadena larga, con distintos grados de oxidación, complicada por la ubicación y número de grupos funcionales, y el grado de ramificación e insaturación.

Los grupos de sustancias principales son los siguientes:

- 1) Hidrocarburos alifáticos. En estas mezclas, predominan los alcanos lineales de número impar de átomos de carbono (C_{21} a C_{35}), aunque existen casos en que la proporción de hidrocarburos de número par de átomos de carbono, puede representar hasta el 50% del total de los mismos. Son poco frecuentes los alcanos no saturados (Shaw y Yeardown, 1966; Sörm et.al., 1964), y aquellos ramificados, que contienen grupos metilo en posición 2 (iso) y en posición 3 (anteiso) (Mold et.al., 1963; Eglinton et. al., 1966).
- 2) Alcoholes. Los mas habituales aparecen como ésteres entre alcoholes alifáticos primarios, con ácidos carboxílicos del mismo tipo, aunque también pueden aparecer libres. Los alcoholes mas frecuentemente aislados, tienen número par de átomos de carbono (C_{22} a C_{32}), lo mismo que los ácidos (C_{14} a C_{34}).

También se identificaron con menor frecuencia, α,ω -dioles e hidroxiácidos (Baker y Martin, 1963).

- 3) Compuestos carbonílicos. Son poco comunes y característicos de algunas especies, como cetonas, β -dicetonas (Horn et.al., 1964) y aldehídos (Radler y Horn, 1965). En algunas plantas se encuentran polímeros de aldehídos, resultado de la condensación de otras moléculas con dichas funciones, producidas por el organismo vegetal.

LOS ALCANOS DE LAS CERAS

Los alcanos se hallan presentes en las ceras vegetales en proporción muy variable, desde pequeñas cantidades en la caña de azúcar (10%) hasta 90% en una Solandra (Solanácea) (Herbin y Robins, 1968a , b).

La ubicuidad de las ceras en las cutículas de las familias de las Angiospermas, resulta bien clara, del estudio de 36 de las mismas que representan unas 60 especies (Herbin y Robins, 1969). Sus resultados son confirmatorios de los primeros trabajos en que predominan como componentes mayores los hidrocarburos de número impar de átomos de carbono, representados principalmente por el de C_{29} (nonacosano), C_{31} (hentriacontano) y C_{33} (tritriacontano).

Dentro de ese muestreo, es mas importante el compuesto de C_{31} , siguiendo el de C_{33} y luego C_{29} . Los hidrocarburos de carbono par, son componentes menores, siendo los mas destacados C_{30} , C_{28} y C_{26} , llegando excepcionalmente a porcentajes elevados aunque sin superar nunca a los de carbono impar.

Estos datos amplían los recopilados anteriormente por Douglas y Hamilton (1966) y Eglinton y Hamilton (1963).

BIOSINTESIS

El hallazgo que los componentes mayores de los alcanos, tenían un número impar de átomos de carbono, indujo a Chanon y Chibnall (1929) a señalar que los mismos podían provenir de ácidos grasos saturados en los que, como es conocido, predominan longitudes de cadena de número par de átomos de carbono.

Pocos años después, Chibnall y Piper (1934), indicaron la hipótesis que los alcanos de cadena larga, provendrían por procesos de prolongación de la cadena de ácidos grasos de cadena media, y posterior decarboxilación.

Esta hipótesis fue confirmada por Kolattukudy (1965, 1966, 1967), empleando precursores con carbonos marcados, quien lo estudió en Brasica oleracea L. La prolongación, ocurriría por el clásico proceso biogénico de producción de ácidos grasos en organismos animales.

Las propuestas efectuadas sobre la posibilidad que ocurra otro tipo de condensación de ácidos grasos, no han sido confirmadas (Kaneda, 1967, 1968).

HIDROCARBUROS DE ASCLEPIADACEAS

La revisión de la literatura, tal como se indicó anteriormente, ha permitido encontrar sólo un trabajo en el cual se identificó y se esta-

bleció la proporción de los hidrocarburos de un grupo (6) de especies de Asclepiadáceas, todas ellas perteneciendo al género Asclepia, y que crecen en los Estados Unidos (Piatak y Eichmeier, 1972).

En las especies estudiadas por los autores mencionados, predominan los alcanos de número de átomos de carbono impar.

En tres de las especies Nº 1, 2 y 3 (Fig. 1), predomina el hidrocarburo de C_{31} ; en dos de ellas, el porcentaje es elevado (63%), mientras que en la tercera (Nº 3), es de 37%. En los tres casos, le sigue en importancia el hidrocarburo de C_{29} . Este hidrocarburo (C_{29}) predomina en dos de las especies restantes, pero la proporción es variable, ya que en una de ellas (Nº 4), el porcentaje es elevado (59%), y en la otra (Nº 5) en cambio en bajo (32%), siguiendo en importancia el hidrocarburo de C_{31} y el de C_{27} .

Este hidrocarburo, de C_{27} , se transforma en el mas importante en la especie Nº 6, seguido de C_{29} y luego C_{31} .

Los autores establecieron en base a esa variabilidad, que no se podían hacer correlaciones quimiotaxonómicas, para tan reducido número de especies.

HIDROCARBUROS DE MORRENIAS

En el caso de las especies de Morrenia estudiadas por nosotros, que también fueron seis, el análisis de los alcanos de las ceras, dio resultados muy semejantes (Fig. 2).

Hay un evidente predominio del componente de C_{31} (entre 40 y 52%)

Contenido total de alcanos de especies de Asclepias.

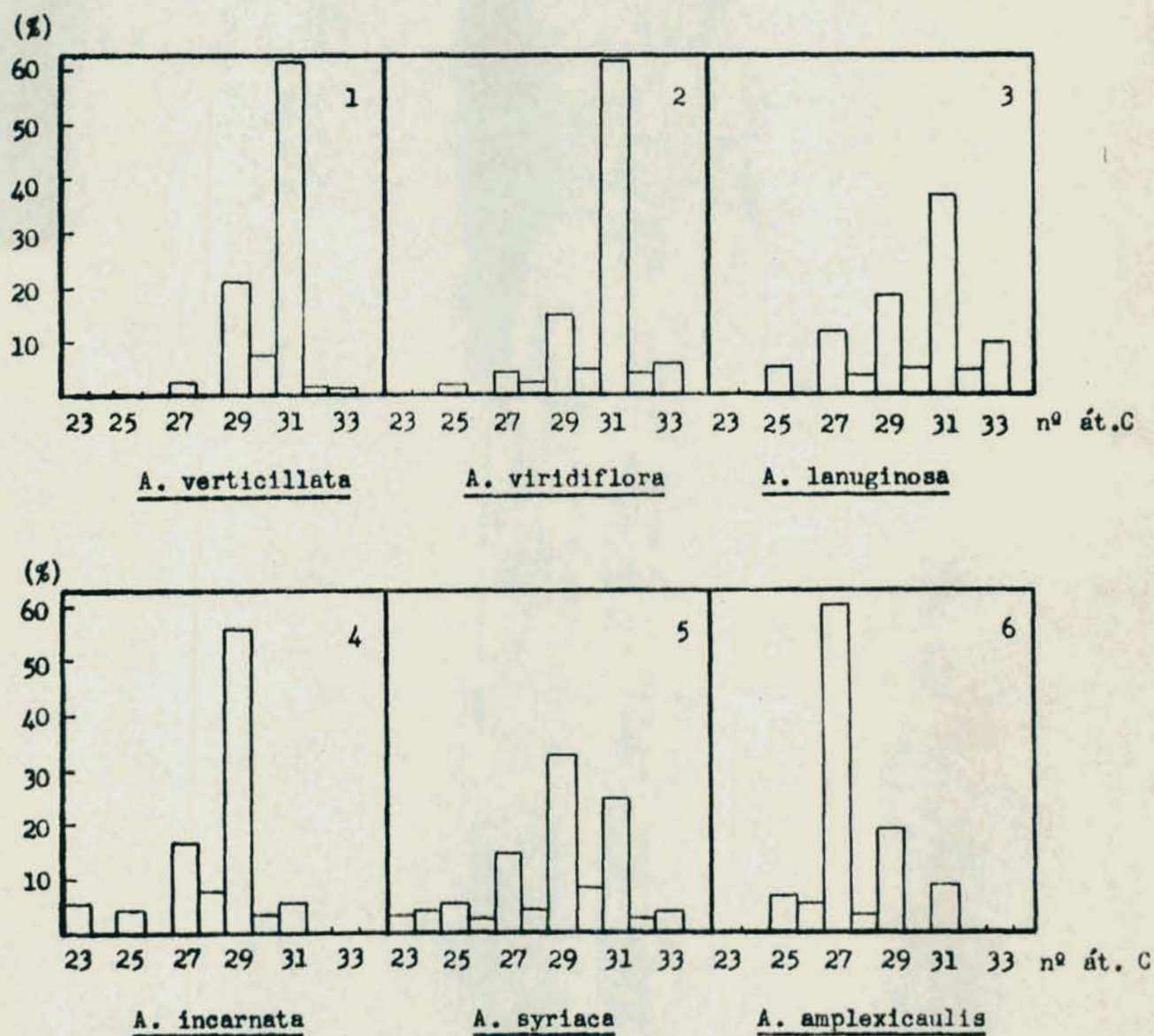


FIGURA 1

en todas las especies estudiadas, seguido en todos los casos, con una variabilidad mayor, del alcano de C_{33} (entre 18 y 33%). A estos siguen en forma declinante, los hidrocarburos de C_{29} a C_{23} , en mucho menor proporción.

Es conveniente señalar, que en el caso de la M. conectens y la M. schulziana, donde el hidrocarburo de C_{33} adquiere una proporción mayor, ocurre consecuentemente una disminución en el porcentaje de C_{31} .

La distribución de los alcanos en las Morrenias, es así mucho mas homogénea en este pequeño número de especies, que en el caso de las Asclepias. Sin embargo el número total de especies de Asclepiáceas estudiadas, no permite generalizar los resultados.

Contenido total de alcanos de especies de Morrenia

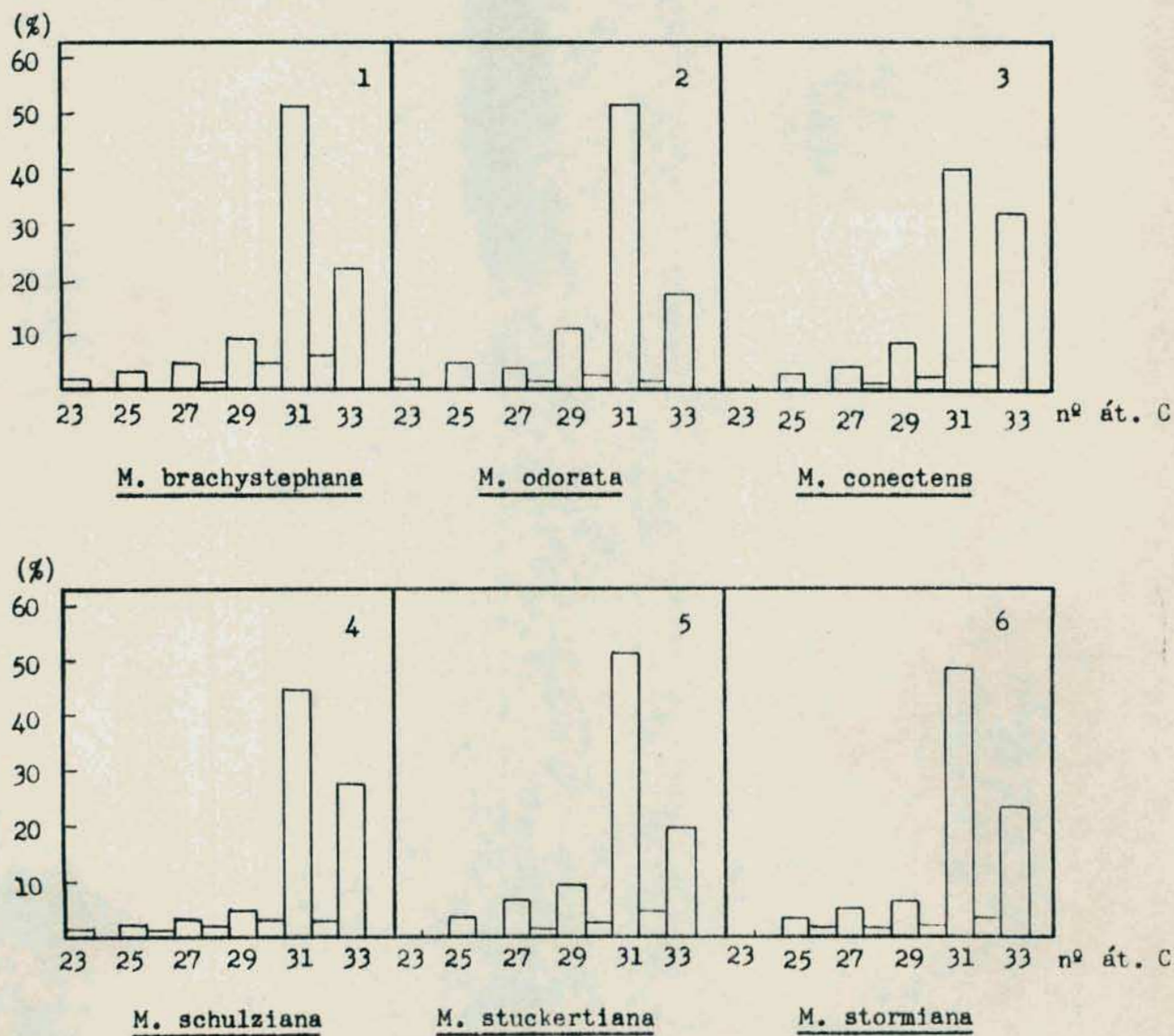


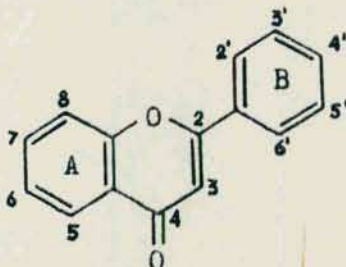
FIGURA 2

IV. LOS FLAVONOIDES

En la Naturaleza se han encontrado una serie de productos con estructura benzopiránica, que poseen un núcleo aromático y que en conjunto se conocen con el nombre de flavonoides.

Una sustancia, con la estructura fundamental de los mismos, fue aislada en 1914 por Müller de Primula japonica y Primula pulverulenta, cuando ya se conocían otras sustancias con igual estructura, pero con distintos sustituyentes oxigenados.

La sustancia (25), se ha denominado flavona (del latín, flavus: amarillo), y puede considerarse también como una 2-fenil cromona.



(25)

El esqueleto hidrocarbonado de 15 átomos de carbono, consiste, de dos anillos aromáticos (A y B), unidos a través de tres átomos de carbono, los cuales forman parte de un anillo γ -pirona. Esta estructura suele esquematizarse como $C_6 - C_3 - C_6$.

Posteriormente se aislaron de las plantas, numerosas sustancias que tenían como base la estructura fundamental (25), con distinto grado de oxidación -dando origen a distintos tipos de compuestos-, que si

bien estaban vinculadas a la misma, presentaban diferencias estructurales mas marcadas.

Como el número de estas variantes creció notablemente, se denominó a estos compuestos con el nombre genérico de flavonoides, incluyendo a veces entre los mismos a algunos que formalmente no tienen el núcleo benzopiránico, pues se consideró como mas importante que respondieran al esquema $C_6-C_3-C_6$.

La mayor parte de los tipos estructurales encontrados, que se incluyen en sentido amplio entre los flavonoides, poseen las estructuras que se indican en la Fig. 3.

El grupo de flavonoides que contiene el mayor número de sustancias es aquel con la estructura carbonada de la flavona (30). La hidroxilación en posición 3 (3-hidroxi flavonas), dio lugar a uno de los grupos mas numerosos, los flavonoles (33). Estos se escriben siempre en la forma enólica, que explica mejor sus reacciones.

La reducción de (30), conduce a las dihidroflavonas (flavanonas, 29), y la reducción de (33), a los dihidroflavonoles (3-hidroxi flavanonas, 31).

En algunos compuestos, se ha reducido químicamente la doble unión del flavonol, y el grupo cetona a alcohol, dando lugar a sustancias denominadas leucoantocianidinas (32) que no se aislaron como tales (ver mas adelante), y de amplia difusión en compuestos condensados mas complejos, como son los taninos no hidrolizables.

En otros casos, cuando el carbono de posición 4 no posee sustituyentes oxigenados, da origen a las denominadas catequinas (34).

RELACIONES ESTRUCTURALES FORMALES ENTRE LAS CLASES DE
COMPUESTOS FLAVONOIDES

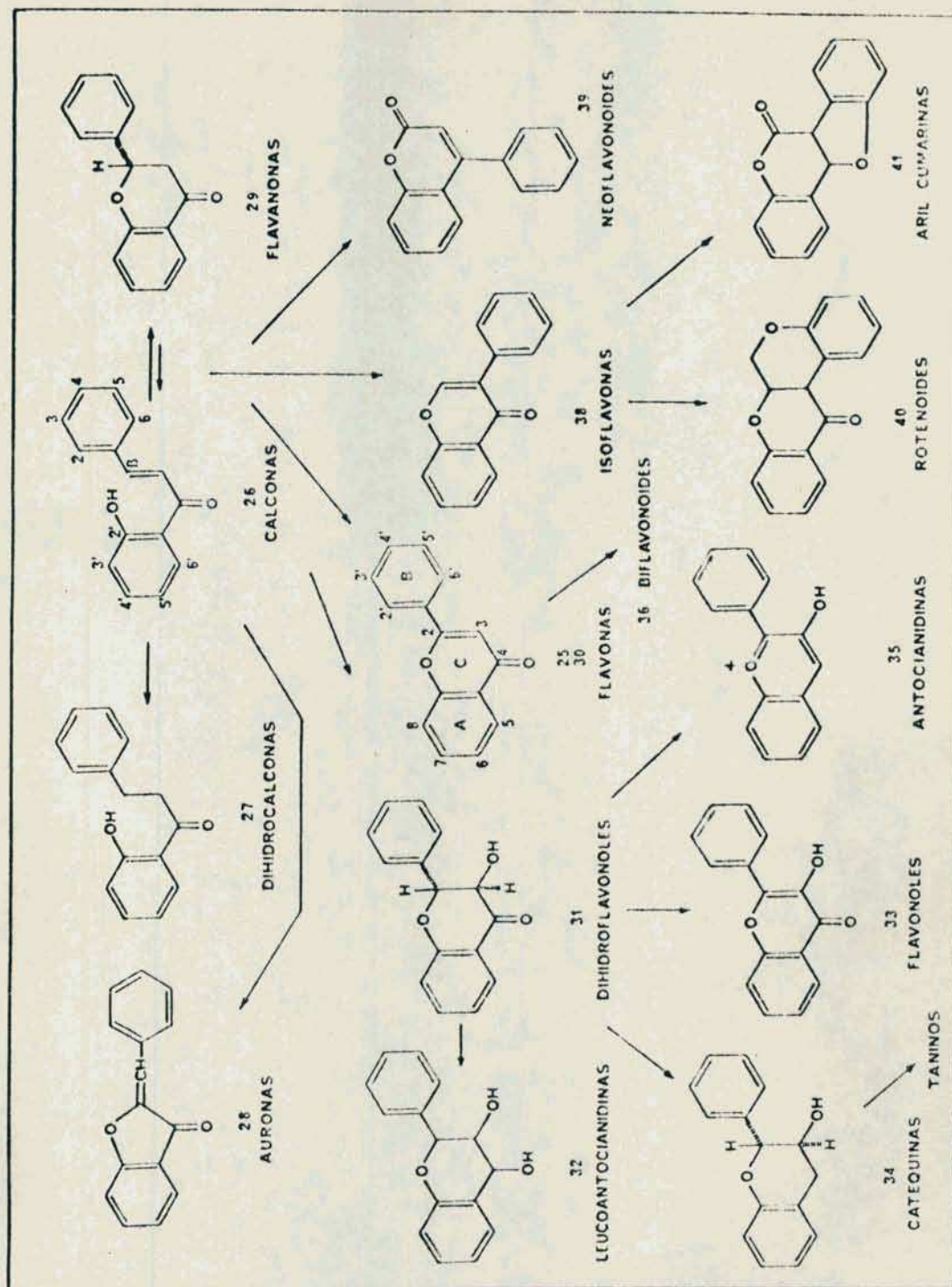
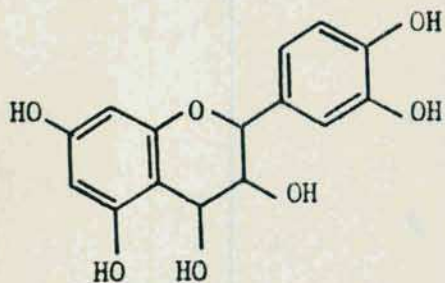


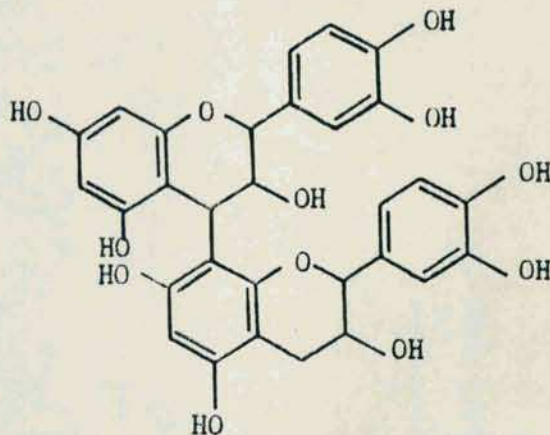
FIGURA 3

Las leucoantocianidinas, que son productos incoloros que fueron aislados como glicósidos por primera vez por Rosenheim en 1920, por acción del ácido clorhídrico, forman las antocianidinas, estructuras de tipo (35). Estas últimas son las agliconas de las antocianinas, sustancias colorantes naturales, muy difundidas entre las plantas.

Se sugirió que las leucoantocianinas, eran las responsables del amplio rango de reacciones que se atribuyen a los taninos. Mas tarde se aclaró que en realidad dos grupos de sustancias eran a las que debía atribuírsele las propiedades mencionadas, los flavan-3,4-dioles (32a)(leucoantocianidinas), y los flavan-3-oles (32 b) dímeros y



(32 a)



(32b)

oligómeros, que se denominaron proantocianidinas (Weinges et.al., 1969; Thompson et.al., 1972).

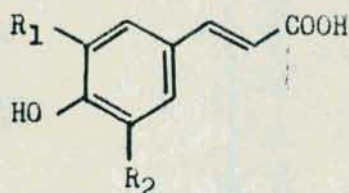
Los demás grupos de compuestos flavonoides, pueden distinguirse por las diferentes posiciones de condensación del grupo fenilo en la cromona (isoflavonoides (38), neoflavonoides (39)), por condensación de dos unidades de los anteriores (biflavonoides, 36) y dímeros y polímeros, o por incorporación de otros átomos de carbono (40), (41).

Cada una de las sustancias anteriores da origen a un grupo de las mismas, como resultado de la sustitución de un átomo de hidrógeno, por grupos oxigenados ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), y la posibilidad de formación de O- y C-glicósidos, a tal punto que no todos los flavonoides se han aislado en estado libre en los vegetales.

En el anillo A (25), de la mayoría de los compuestos flavónicos, los grupos hidroxilo están sustituidos en carbono 7, o en carbono 7 y carbono 5, y generalmente no están metilados.

El anillo B (25), está usualmente sustituido por 1, 2 ó 3 grupos hidroxilos o metoxilos. Cuando hay un sólo sustituyente, éste ocupa en la mayor parte de los casos la posición 4', que es para con respecto al punto de unión del anillo al resto de la molécula. El segundo y tercer sustituyente, ocupan una posición orto al primero, es decir en los carbonos 3' y 5'; estos dos últimos grupos a menudo están metilados. La hidroxilación del anillo B, se parece por lo tanto a la encontrada en los ácidos cinámicos.

Algunos derivados del ácido cinámico de aparición habitual en los vegetales, son los indicados en las fórmulas (42) a (45).



- (42) $R_1 = R_2 = -H$ ác. p-cumárico
 (43) $R_1 = -OH$; $R_2 = -H$ ác. cafeico
 (44) $R_1 = R_2 = -OCH_3$ ác. sinápico
 (45) $R_1 = -OCH_3$; $R_2 = -H$ ác. ferúlico

Existen además un grupo reducido de flavonoides, con un número elevado de sustituyentes oxigenados (por ej. gardenina, 5-hidroxi-3,3',4',5',6,8-hexametoxiflavona; hibiscetina, 3,3',4',5,5',7,8-hepta-hidroxi-flavona), estos compuestos, además de poseer la sustitución clásica, presentan funciones oxigenadas en posiciones menos frecuentes.

En muchos de los casos, los flavonoides existen en las plantas como glicósidos, uno o dos de sus grupos hidroxilos (excepcionalmente tres), están unidos a un hidrato de carbono. En algunas oportunidades, se han obtenido de plantas flavonoides libres, lo cual es probable que se produzca durante el curso de la extracción. La mayoría de los tejidos vivos, contienen glicosidasas muy activas que pueden actuar aun en presencia de solventes.

Generalmente los glicósidos flavonoides, son mas solubles en solventes polares que las agliconas correspondientes, y en cambio la misma disminuye en solventes no próticos.

Hay también una variación en los hidratos de carbono que forman los glicósidos en los flavonoides, son pentosas y hexosas (monósidos) y di y trisacáridos (biósidos y triósidos). La D-glucosa es la mas frecuente, siguiendo la D-galactosa y L-ramnosa, y estas mas corrien-

temente que la L-arabinosa; el ácido D-glucurónico y la D-xilosa son raros.

Mas rara aun es la presencia de apiosa, en un disacárido (apio-sil-glucosa), que se encuentra en el glicósido apiina (aislado del perejil), donde la aglicona es la apigenina (4',5,7-trihidroxi flavona).

Las posiciones de glicosilación mas frecuentes son en los hidroxilos de carbono 3 y 7, le siguen en importancia O-glicósidos en 5 y finalmente en 4'.

En algunos casos también se aislaron C-glicósidos, y otras veces flavonoides con restos C-isoprenicos. Mas reciente fue el aislamiento de estos compuestos como ésteres sulfato (Harborne, 1975).

BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES

Introducción. La buena estabilidad de la mayor parte de los flavonoides, su presencia en un número considerable de especies vegetales, unido a una cierta facilidad de aislamiento e identificación, determinó que se hayan aislado varios centenares de los mismos, predominantemente de vegetales superiores.

Cuando se pudieron usar isótopos radiactivos para efectuar estudios metabólicos (Birch y Donovan, 1953), se trató de corroborar las hipótesis inicialmente propuestas por Sir Robert Robinson (1921), que los flavonoides están formados por una unidad C_6-C_3 que se unía a una unidad C_6 . La primera unidad (C_6-C_3) provendría del ácido

cinámico o un compuesto relacionado, y la unidad C_6 de tres unidades de acetato.

El progreso ha sido considerable, y las experiencias con materiales marcados dieron una información que actualmente está siendo analizada con detalle, mediante el empleo de las enzimas que intervienen en cada una de las etapas de su metabolismo.

En base a las hipótesis de Birch y Donovan (1953), Grisebach (1962), postuló que la primera reacción en la biosíntesis de flavonoides es la condensación de un ácido cinámico activado (unidad C_6-C_3 , probablemente como éster de la Coenzima A (CoA)), con la entidad que formará posteriormente el ciclo A, para dar el primer producto estable, una calcona. Esa entidad, se forma a partir de ácido acético, via malonil-SCoA, sin conocerse las etapas que conducen de malonil-SCoA al núcleo A unido al resto, para dar la agrupación $C_6-C_3-C_6$.

En la Figura 4 puede verse la formación de una calcona, a través de un mecanismo hipotético (sin establecer el número de etapas en que ocurre).

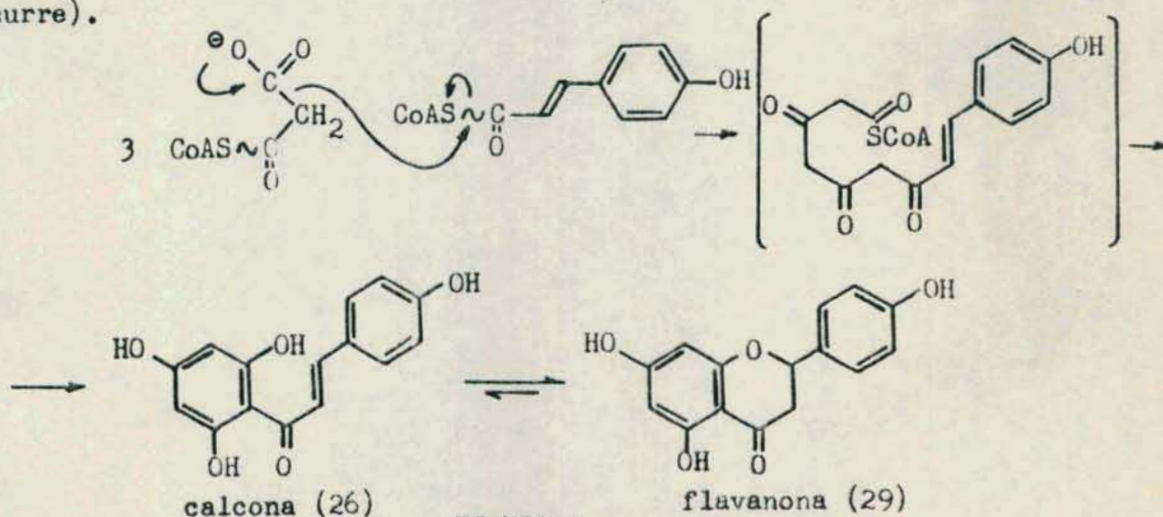
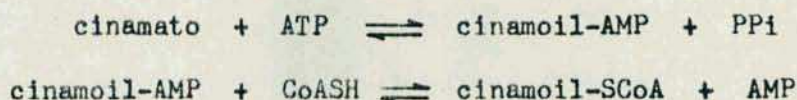


FIGURA 4

Se demostró posteriormente que en los tejidos vegetales, se encuentra una enzima que cataliza la transformación de la calcona en flavanona en forma reversible, produciendo por lo tanto un equilibrio (Wong y Moustafa, 1966).

Los postulados de Grisebach, encontraron sólido apoyo experimental, cuando Walton y Butt (1971) demostraron la existencia en varias especies vegetales de una cinamoil-SCoA sintetasa, proponiendo un sistema de activación similar al de la formación de acetil-SCoA.



BIOSINTESIS DE LA UNIDAD C₆-C₃

La unidad C₆-C₃ de los compuestos fenilpropanoides naturales, se origina en el metabolismo de los hidratos de carbono, siendo el compuesto clave, el ácido shikímico, que es el precursor de un buen número de esquemas biosintéticos, y sobre el cual hay buenas revisiones como las de Bohm (1965) y Geissman y Crout (1969).

La conversión de ácido shikímico en L-fenil alanina y L-tirosina, aminoácidos que en las plantas son los precursores de los ácidos cinámicos, puede verse en la Figura 5, en la cual se observa como el ácido pirúvico, aporta tres átomos de carbono, produciendo en primer lugar el ácido corísmico, el cual conduce por mecanismos enzimáticos a los ácidos fenilpirúvicos, los cuales a su vez por procesos de aminación dan los aminoácidos mencionados.

Diagram illustrating the metabolic pathways of shikimate and tyrosine, showing the conversion of carbon hydrates to various aromatic compounds and their subsequent metabolism.

SHIKIMATE PATHWAY:

- HIDRATOS DE CARBONO → SHIKIMATO
- SHIKIMATO → SHIKIMATO-5-(P) → 3-ENOL PIRUVIL SHIKIMATO-5-(P) → CORISMATO

TYROSINE PATHWAY:

- SHIKIMATO → SHIKIMATO-5-(P) → 3-ENOL PIRUVIL SHIKIMATO-5-(P) → CORISMATO → L-TIROSINA
- L-TIROSINA → L-FENIL ALANINA → AC. CINANTICO
- L-TIROSINA → L-FENIL ALANINA → AC. CINANTICO
- L-TIROSINA → L-FENIL ALANINA → AC. CINANTICO

Other Pathways:

- SHIKIMATO → SHIKIMATO-5-(P) → 3-ENOL PIRUVIL SHIKIMATO-5-(P) → CORISMATO
- SHIKIMATO → SHIKIMATO-5-(P) → 3-ENOL PIRUVIL SHIKIMATO-5-(P) → CORISMATO
- SHIKIMATO → SHIKIMATO-5-(P) → 3-ENOL PIRUVIL SHIKIMATO-5-(P) → CORISMATO

PAL fenil alanina amoníaco liasa
 TAL tirosina amoníaco liasa
 (P) fosfato

FIGURA 5

Se ha demostrado que la L-fenil alanina o la L-tirosina, en ciertas plantas, pueden considerarse intermediarios obligados, en las transformaciones biosintéticas que conducen a los ácidos cinámicos, cumarinas y unidades fenil propanoides de ligninas y diversos flavonoides (Grisebach y Barz, 1969; Harborne, 1967).

Pero no sería difícil la existencia de otros mecanismos de producción de dichas sustancias, pues Swain y Williams (1970), administrando a plantas de girasol (Helianthus annuus), L-fenil alanina y sacarosa difusamente marcadas, encontraron una incorporación de ^{14}C a ácido cafeico que no podía esperarse por el mecanismo anterior.

Posteriormente, Barz y Hösel (1971), demostraron en Cicer arietinum, que el ácido cinámico-3- ^{14}C es mejor precursor que D,L-fenil alanina [^{14}C], de flavonoles como quercetina, canferol e isoramnetina.

CONVERSION DE CALCONAS A FLAVONOIDES

La posición clave de las calconas en la biosíntesis de flavonoides, está actualmente bien establecida. Experimentos efectuados con sustancias marcadas, mostraron que las calconas son precursores de flavanonas (Wong, 1965); flavanonoles (Wong, 1965; Grisebach y Kellner, 1965); flavonas (Grisebach y Bilhuber, 1967); isoflavonas (Grisebach y Brandner, 1961); flavonoles (Grisebach y Patschke, 1961); catequinas (Patschke y Grisebach, 1965) y auronas (Wong, 1966).

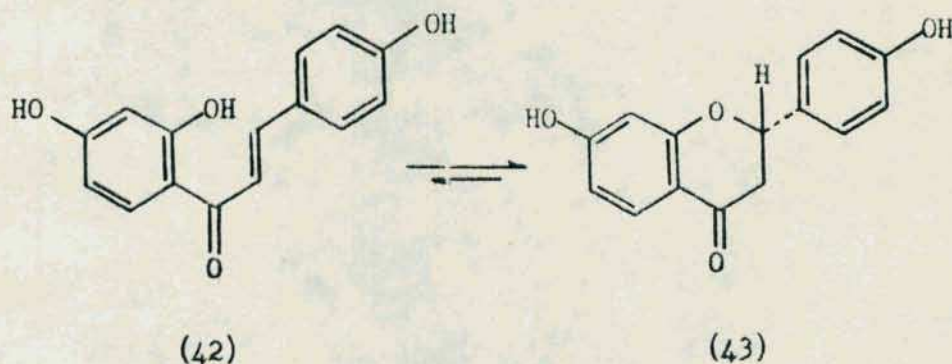
La tendencia actual de estos estudios, es tratar de establecer la secuencia en las etapas entre las calconas y los diferentes flavonoides

y la búsqueda de las enzimas que catalizan las mismas.

La transformación de las calconas en flavanonas, es una reacción reversible, catalizada *in vitro* por ácidos y bases (Geissman y Clinton, 1946; Zemplén *et.al.*, 1944), e *in vivo* por enzimas específicas presentes en plantas, donde las flavanonas predominan en el equilibrio.

El problema era determinar, si ambas (calconas y flavanonas) eran los precursores primarios de los demás flavonoides, o una de ellas actuaba como tal. Además resultó interesante conocer cual de los isómeros de flavanona se formaba a partir de calconas por acción enzimática.

En uno de los primeros experimentos efectuados con una enzima obtenida de habas de soya (Wong y Moustafa, 1966), la isomerasa dio lugar a la formación de uno sólo de los isómeros ópticamente activos, levógiro, de flavanona (43).

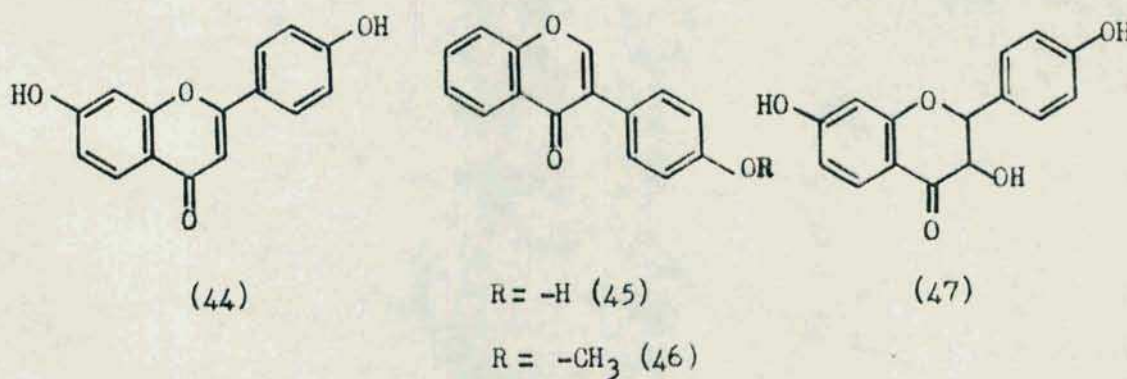


Los trabajos de Wong (1968) y de Wong y Grisebach (1969), empleando mezclas de calconas y flavanonas marcadas con ^{14}C , indicaron que solamente las primeras son precursores de los compuestos flavonoides.

Wong (1968) llevó a cabo dos experiencias paralelas, empleando mezclas de una calcona, la isoliquiritigenina (42), con el isómero levógiro de la flavanona obtenido por acción enzimática, la (-)-liquiritigenina (43).

En la experiencia a), se administraron cantidades iguales de ^{14}C -isoliquiritigenina [$\text{CO}-^{14}\text{C}$] y (-)-liquiritigenina; y en la experiencia b) ^{14}C - (-)-liquiritigenina con la calcona sin marcar. Ambas mezclas se administraron individualmente a brotes de trébol (Trifolium subterraneum), y a extractos libres de células de brotes de garbanzo (Cicer arietinum).

Del trébol se aislaron: 4',7-dihidroxi flavona (44) y las iso-flavonas daidzeina (45) y formononetina (46); y de los extractos preparados con brotes de garbanzo, solamente el flavononol, garbanzol (47) todos los cuales tenían actividad específica, vale decir que presentaban incorporación del producto marcado suministrado.



La radiactividad de los 4 productos aislados, cuando se administró

la mezcla a), fue el doble que cuando se administró la mezcla b), (en ambos casos se partió de iguales actividades específicas), lo cual se interpretó, considerando a la calcona como el mejor precursor de flavonas, isoflavonas y flavononoles.

Estos resultados fueron confirmados en experiencias que solamente se diferenciaron de las anteriores, en que se administró simultáneamente mezclas equimoleculares de isoliquiritigenina- ^{14}C y (-)-liquiritigenina tritiada. En los compuestos aislados ya mencionados, las relaciones T/ ^{14}C indicaron que la calcona se incorporaba mas rápido que la flavanona, por lo tanto, los autores confirmaron que la calcona sería el mejor precursor de estos flavonoides. Debido a la reversibilidad de la reacción calcona-flavanona, se comprende que las flavanonas mostraran también incorporación en flavonoides (Patschke et.al., 1964; 1966; Grisebach, 1965).

Sin embargo, el camino por el cual las calconas pueden transformarse en algunos flavonoides, sin pasar por la etapa de flavanonas, no está totalmente aclarado, razón por la cual, Grisebach se refiere actualmente a estos dos precursores, como el par calcona-flavanona (Zaprometov y Grisebach, 1973).

CONVERSION DE CALCONAS A 3-HIDROXIFLAVANONAS (DIHIDROFLAVONOLES)

Se formularon varios caminos para la formación de 3-hidroxisflavanonas: 1) oxidación directa de una flavanona en C_3 ; 2) formación vía epóxido de calcona; 3) camino flavanona-flavona-flavonol-dihidroflavonol; 4) adición de agua a la doble unión 2,3 de una flavona. Figura 6.

Podrían descartarse los caminos 1 y 2, o los caminos 3 y 4, empleando una calcona marcada con tritio y ^{14}C como precursor.

Grisebach y Kellner (1965) estudiaron el problema, administrando 2',4,4',6'-tetrahidroxi calcona-2'-glucósido- [β - ^{14}C - β -T] (48), con una relación $^{14}\text{C}/\text{T}$ de 1:2,1 a hojas de *Chamaecyparis obtusa*, de la cual se había aislado previamente 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona-3-xilósido (49). Después de varias purificaciones, el xilósido de taxifolina radiactivo (49), mostró una relación de $^{14}\text{C}/\text{T}$ de 1:2,3. Estos resultados mostraron que el tritio se retiene en la posición 2 durante la biosíntesis de taxifolina (49, R_2 : -H); de esta manera se descartaron los caminos 3 y 4. (Figura 6)

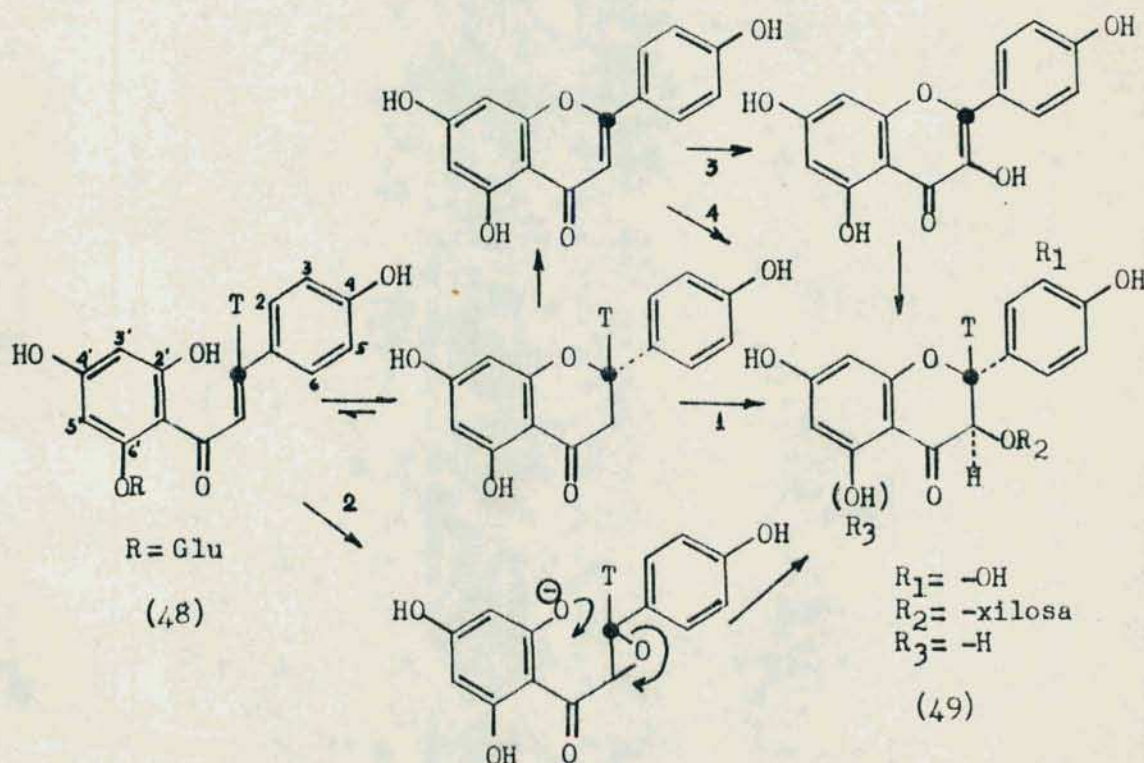
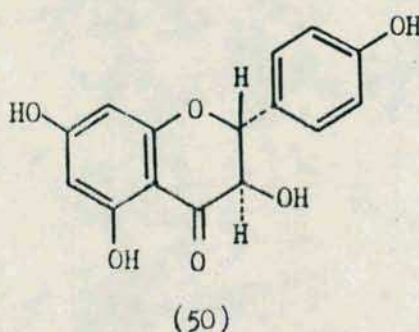


FIGURA 6

En relación a los caminos 1 y 2, hay que discutir primero algunos aspectos estereoquímicos. Los dihidroflavonoles, tienen dos carbonos asimétricos y pueden existir 4 formas ópticamente activas (Tominaga, 1958). Todos los dihidroflavonoles encontrados en la Naturaleza tienen los grupos 2-arilo y 3-hidroxilo en posición trans (ecuatorial-euatorial, Whalley, 1962), p. ej. (50)



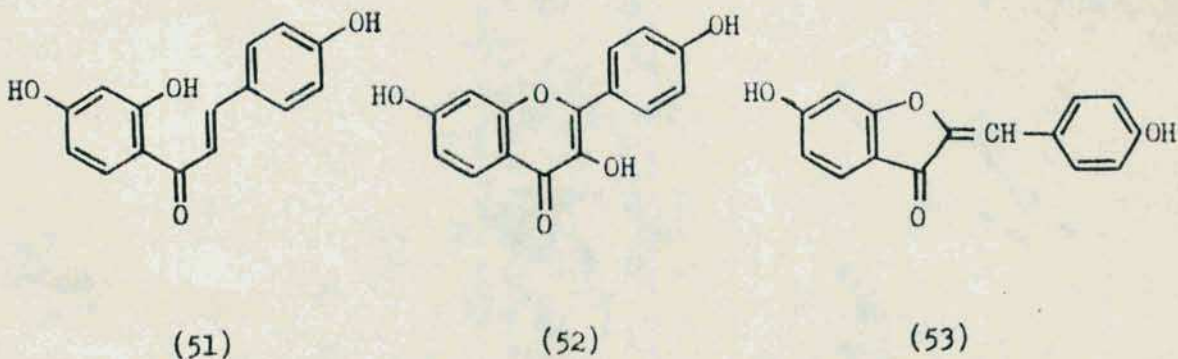
Esto es análogo para los compuestos de la serie de las catequinas. Así, las (-)-flavanonas y los (+)-dihidroflavonoles tienen la misma estereoquímica absoluta en el C-2 (Whalley, 1962).

La síntesis de dihidroflavonoles in vitro, a través de epóxidos de calcona, también conduce a productos trans (Fischer y Arlt, 1964). Por otro lado, la oxidación directa de flavanonas en C-3 (p. ej. con el reactivo de Fenton) parece conducir a cis-3-hidroxiflavanonas, o sea distintas a las naturales (Mahesh y Seshadri, 1955).

Sin embargo hay enzimas oxigenasas, que sustituyen átomos de hidrógeno ecuatoriales, por hidroxilo, sin cambio de configuración (Hayano et.al., 1958). Por lo tanto es posible que las 3-hidroxiflavanonas se formen de sus precursores, flavanona, por acción de enzimas

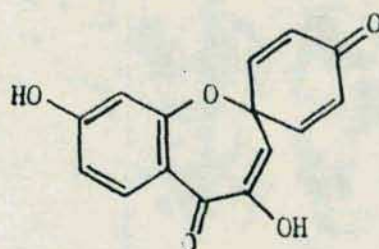
oxidantes específicas, o a través de un epóxido de calcona, como se sugirió antes, sin estar aclarado actualmente el verdadero intermediario biogénico, que se sigue buscando. Estos experimentos muestran las dificultades que existen en relación a los caminos 1 y 2.

Recientemente, dos grupos de trabajo, estudiaron la conversión enzimática de calcona a dihidroflavonol y/o auronas. Uno de los grupos (Rathmell y Bendall, 1972), oxidó 2',4,4'-trihidroxicalcona (51) con una peroxidasa aislada de rábano picante, en presencia de agua oxigenada. Obtuvieron 4',7-dihidroxi-2-flavonol (52), y 4',6-dihidroxi-aurona (53). Además, los intermediarios aislados, incluyeron estereoisómeros de 3,4',7-trihidroxi-2(2'-hidroxibencil) cumaranona.



El segundo grupo (Wong y Wilson, 1972), usando una enzima purificada de brotes de garbanzo, detectó los mismos intermediarios, y también una espirodienona inestable (54), isómera de 4',7-dihidroxi-2-flavonol. Se formaron además varios compuestos, algunos de los cuales representan estereoisómeros de una espirodienona hidratada. Pero el signi-

ficado de estos productos en la biosíntesis de flavonoides in vivo, todavía no ha sido determinado.



(54)

3-HIDROXIFLAVANONAS COMO PRECURSORES DE FLAVONOLES Y ANTOCIANIDINAS

De los resultados obtenidos con calconas marcadas (Grisebach y Patschke, 1961; Patschke y Grisebach, 1965), el camino que conduce a flavonoides con distintos estados oxidativos, no ocurre antes de la formación del intermediario de C_{15} . Esta conclusión fue también confirmada por Harborne, trabajando con mutantes de color (Harborne, 1962).

Las 3-hidroxyflavanonas (dihidroflavonoles), pueden considerarse como los precursores inmediatos de flavonoles y antocianidinas. La deshidrogenación de los dihidroflavonoles naturales, se consigue fácilmente en el laboratorio, ya que los átomos de hidrógeno que se eliminan de las posiciones 2 y 3 están en posición trans (Fukui y Fujimoto, 1965).

La conversión de dihidroflavonoles a antocianidinas, con el mismo nivel de hidroxilación, puede tener lugar por el mecanismo indicado en la Figura 7.

Para probar esta hipótesis experimentalmente, Barz et.al., (1965),

y Patschke et.al., (1966a), administraron 3,4',5,7-tetrahidroxiflavonona(dihidrocanferol) (55), marcado con tritio (estando localizada, 41,5% de la actividad en los C-2 y C-3), y D,L-fenil alanina-1- ^{14}C

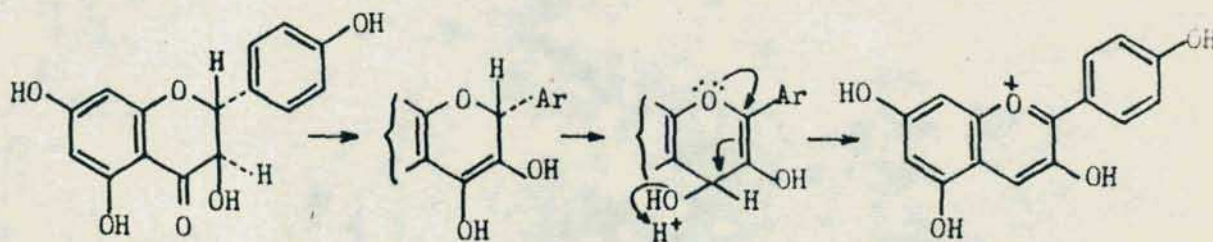


FIGURA 7

como standard interno, a brotes de trigo sarraceno, y determinaron la actividad correspondiente a tritio y ^{14}C en quercetina (56) y cianidina (57) que aislaron de esos brotes. Se hicieron experimentos controles con canferol-T (58) y fenil alanina-1- ^{14}C .

Los resultados obtenidos, permitieron establecer, que el dihidrocanferol (55) es un precursor mas eficiente que el canferol (58) en la biosíntesis de flavonoles y antocianidinas. El aumento de la relación $\text{T}/^{14}\text{C}$ en la incorporación de dihidrocanferol en quercetina (56), demostró que este compuesto es mejor precursor que la fenil alanina, para la formación de flavonoles. Como el dihidrocanferol fue un precursor mas eficiente que el canferol en la biosíntesis de quercetina, esto indicó que el primer compuesto es mejor sustrato para introducir un grupo hidroxilo en la posición 3'. Por consiguiente la reacción de hidroxilación ocurre antes de la deshidrogenación, y la incorporación en (58) tendría lugar a través de dihidrocanferol (55) (Figura 8).

BIOSINTESIS DE FLAVONOLES Y ANTOCIANIDINAS

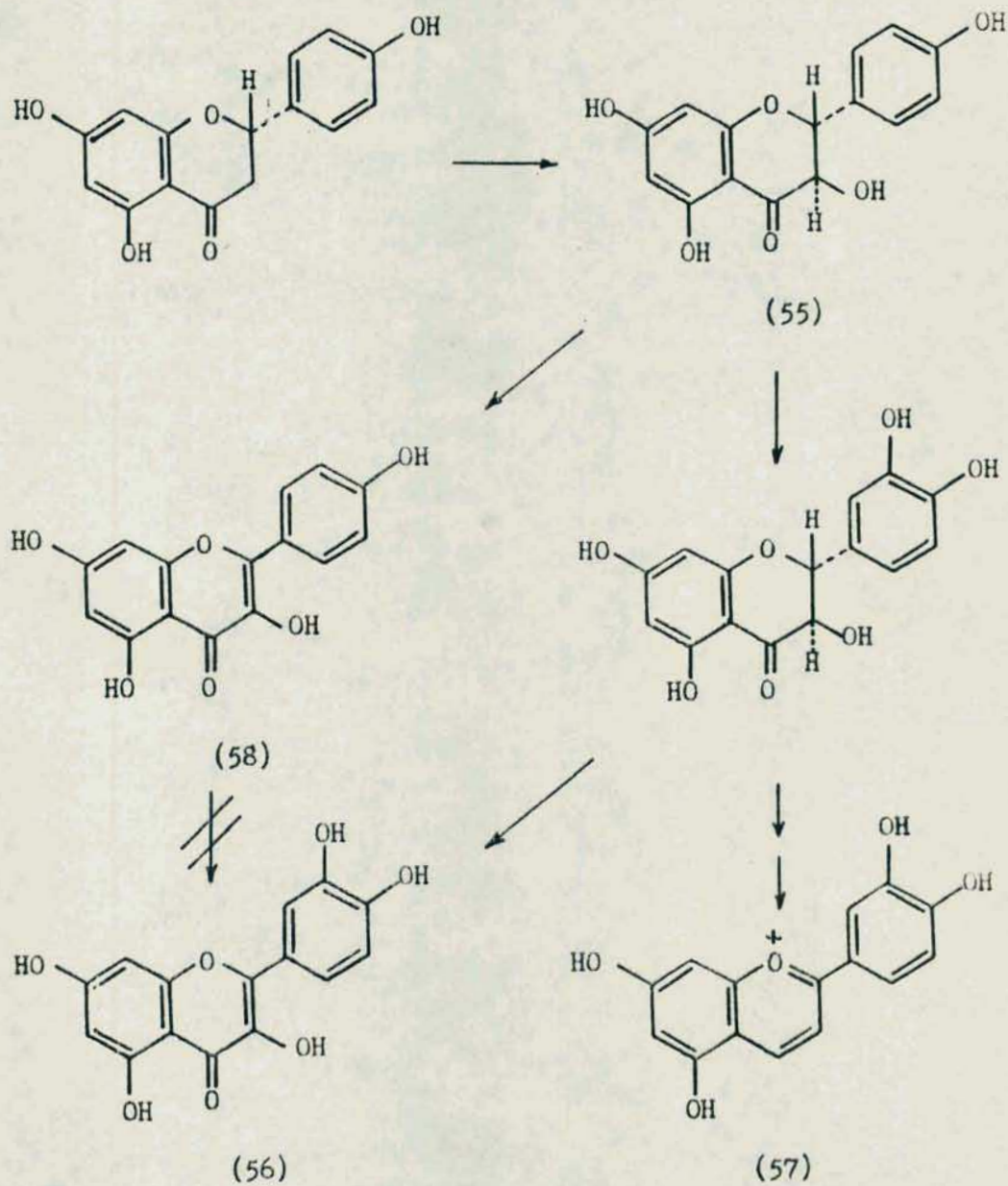
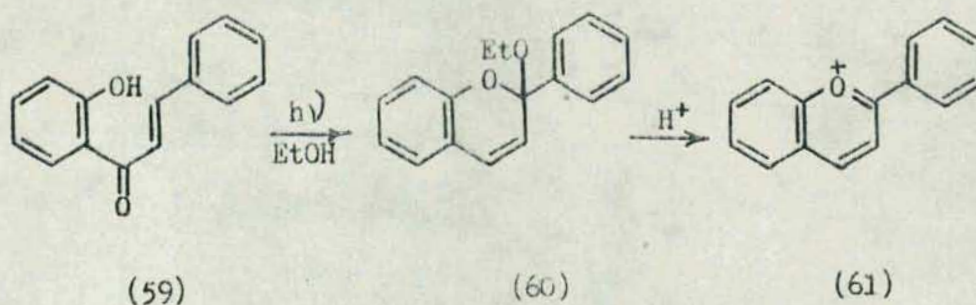


FIGURA 8

BIOSINTESIS DE ANTOCIANIDINAS Y LEUCOANTOCIANIDINAS

Se sabe que las antocianidinas (agliconas de las antocianinas), se forman a través del camino principal de flavonoides, probablemente pasando por dihidroflavonoles, pero queda por dilucidar las últimas etapas en su biosíntesis. En la mayoría de las plantas, uno de los últimos pasos está controlado por la luz. Fueron Dewar y Sutherland (1970) quienes llevaron a cabo experimentos fotolíticos que sugirieron que las antocianidinas podrían formarse directamente de calconas.

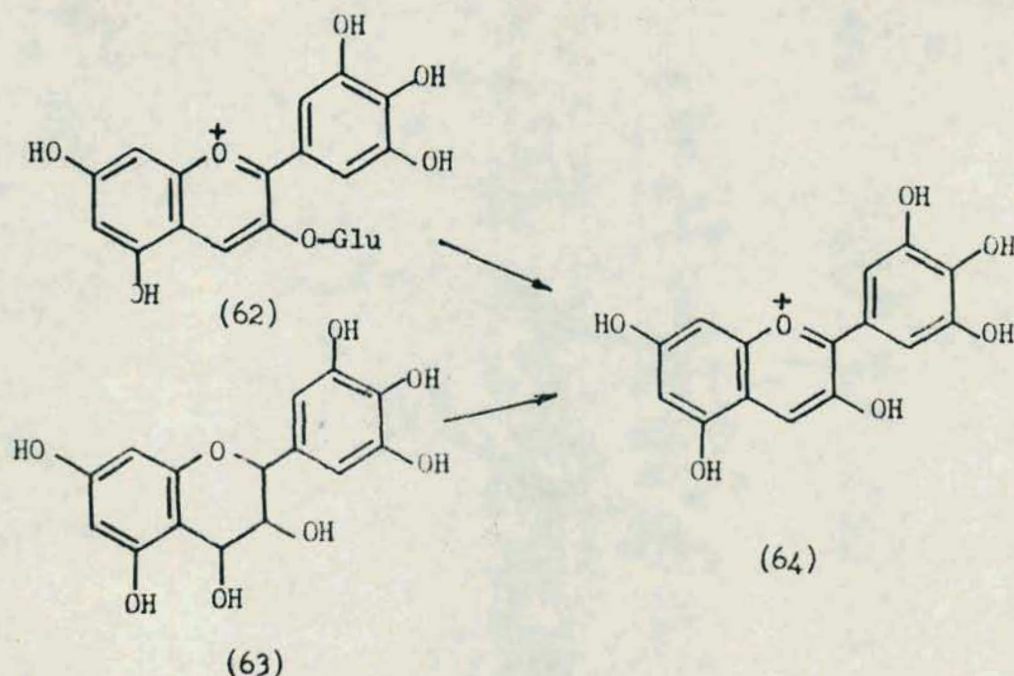
La fotólisis de 2-hidroxicalcona (59) en etanol, durante 8 horas, dio 2-etoxiflav-3-eno (60) con un 96% de rendimiento, el cual es fácilmente convertido en medio ácido en la sal de flavilio (61).



Los precursores naturales de las antocianidinas, de esta manera, serían polihidroxicalconas, y actualmente se está tratando de obtener resultados comparables con sustratos mas complejos.

Las antocianidinas, pueden obtenerse químicamente por dos métodos distintos. Por ejemplo la delfinidina (64), se obtuvo por hidrólisis

de la delfinina (62), o por tratamiento ácido del flavan-3,4-diol (leucodelfinidina) (63).

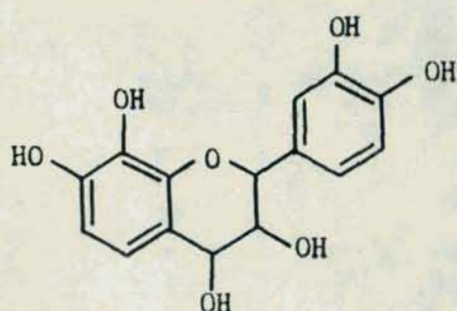


Su fácil interconversión química, sugirió una relación biogénica próxima con las antocianidinas, pero se acepta en general que las leucoantocianidinas se biosintetizan por una ruta distinta.

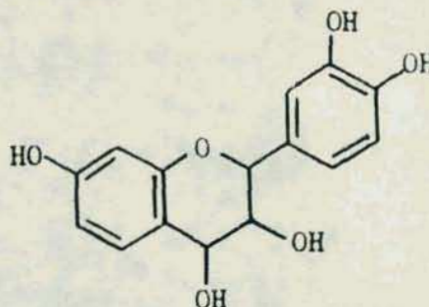
Los datos genéticos (Alston y Hagen, 1955) y una reciente investigación de los pigmentos de mutantes coloreados de *Zea mays* (Styles y Ceska, 1972), señalaron distintos caminos de biosíntesis.

Es significativo el hecho que las primeras leucoantocianidinas aisladas, melacacidina (65) y mollisacacidina (66), dieron por tratamiento ácido, antocianidinas con estructuras poco comunes, lo cual verificaría la hipótesis anterior. (Sobre la nomenclatura aplicada a estos compuestos, ver al comienzo de este capítulo).

En un estudio de la química y distribución de proantocianidinas Thompson et.al., (1972), aislaron varias proantocianidinas diméricas



(65)



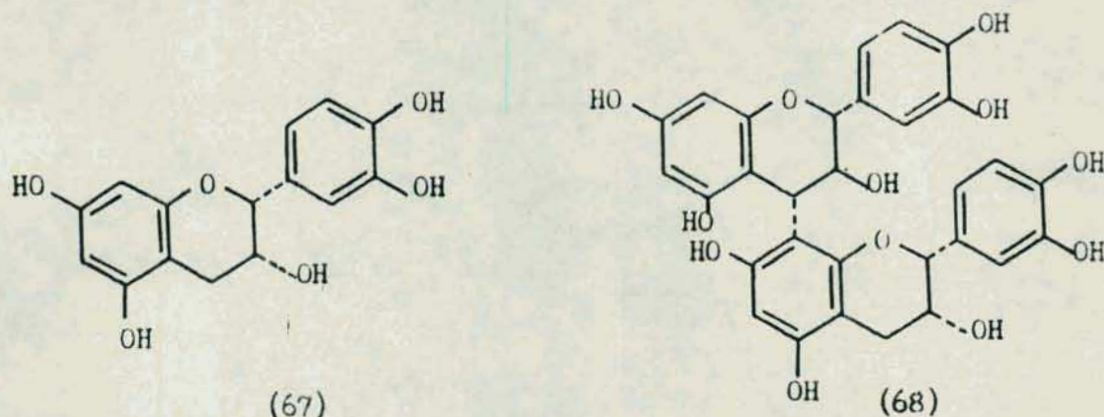
(66)

y triméricas. El estudio mostró que estaban siempre acompañadas por (+)-catequina y (-)-epicatequina, o una mezcla de ambas, de acuerdo a la composición de la proantocianidina presente en la planta.

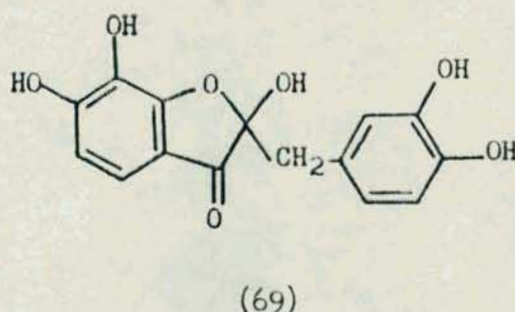
En contraste, los flavan-3,4-dioles, estaban ausentes, y los autores sugirieron que la síntesis de proantocianidinas, no involucra la condensación catalizada por ácidos de estos 3,4-dioles, como se mencionó frecuentemente. En su lugar se propuso, que las proantocianidinas, se forman exclusivamente por polimerización oxidativa de flavan-3-oles y basaron esta idea, en experimentos con sustancias marcadas.

Thompson et.al., (1972) administraron (-)- [U- ^{14}C] -epicatequina (67) a retoños de Rubus idaeus, y después de 7 días, aislaron la proantocianidina (68) que contenía un 14% de la actividad de la sustancia original. Un aporte indirecto a este trabajo, provino de un estudio de los flavonoides de duramen de Acacia nigrescens (Fourie et.al., 1972).

Todos los componentes presentes tenían siempre los carbonos 3', 4', 7 y 8 sustituidos con hidroxilos. La sustitución en la posición 8 prevenía la formación de proantocianidinas, y por lo tanto no podrían



detectarse ninguno de tales polímeros. El precursor necesario, 3',4', 5,7-tetrahidroxiflavan-3-ol también estaba ausente. Por otro lado, estaban presentes la calcona (26), flavanona (29), flavonol (33), dihidroflavonol (31) y el flavan-3,4-diol (32) (Figura 3), todos los cuales respondían a la sustitución 3',4',7,8-tetrahidroxi de este último, y la bencilcumarana nigrescina (69).



Harborne, sugirió que la sustitución de los flavonoides en la posición 8 (por hidroxilos en Acacia, o por glicosilación con unión C-C), es de un significado evolutivo especial (Harborne, 1972). Representaría un mecanismo primitivo (como la síntesis de proan-

tocianidinas) y estaría reemplazado en taxas mas avanzados por la sustitución en la posición 6. El mecanismo por el cual grupos funcionales se ubican en la posición 6 u 8 del núcleo flavonoide, es aun desconocido.

BIOSINTESIS DE ISOFLAVONOIDES

Las isoflavonas son isoméricas con las flavonas, y varios autores desarrollaron teorías sobre la formación de la estructura de las primeras. Geissman y Hinreiner (1952), y Whalley (1956), sugirieron que podría migrar un grupo fenilo durante el curso de la biosíntesis, mientras que otros investigadores consideraban improbable tal reordenamiento (Warburton, 1954).

Los principales estudios sobre la biosíntesis de isoflavonas, se llevaron a cabo con trébol rojo (*Trifolium subterraneum*), y germen de "chana" (*Cicer arietinum*). El primero, contiene formononetina (7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona), y el segundo formononetina y biochanina A (5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona) como isoflavonas principales.

La incorporación de fenil alanina-carboxilo- ^{14}C -, 2- ^{14}C -, 3- ^{14}C en la formononetina, indicaron una distribución de radiactividad como la indicada en la Figura 9, y que fue demostrada por degradación de la isofla-

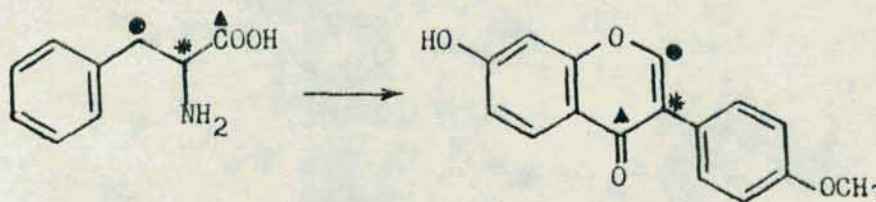
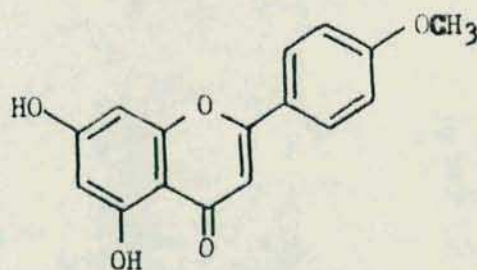


FIGURA 9

vona (Grisebach, 1959; Grisebach y Doerr, 1959). Estos resultados, mostraron que no se pierde en ningún momento el carboxilo de la fenil alanina, y que debe ocurrir una migración, en alguna etapa, del grupo fenilo.

Experimentos en los cuales se administró a trébol rojo y germen de chana 2',4,4'-trihidroxi calcona-4'-glucósido- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$, condujeron a la conclusión que la biosíntesis de isoflavonas procede de la etapa calcona-flavanona. La trihidroxicalcona, es incorporada en forma específica en formononetina, pero no en biochanina A, ya que esta tiene un grupo hidroxilo adicional en el anillo A. En contraste, 2',4,4',6'-tetrahidroxi calcona-4'-glucósido- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$, es un buen precursor para biochanina A, mientras que la incorporación es muy pequeña en formononetina (Grisebach y Brandner, 1962; Grisebach y Brandner, 1961; Grisebach y Patschke, 1960).

La prueba final para la demostración de la incorporación de calconas-flavanonas en isoflavonas, se realizó con la flavanona (70) marcada en varios carbonos (Patschke *et.al.*, 1964).



(70)

En concordancia con los resultados anteriores, la incorporación de

(70) en la isoflavona con el mismo grado de hidroxilación (biochanina A) fue mucho mayor que en formononetina. La degradación de la isoflavona, mostró que sólo hubo un ligero cambio en la relación de actividades entre el anillo A/C-2 en biochanina A, mientras que en formononetina esta relación cayó 1:7.

También se determinó la incorporación de (+) y (-)-4',5,7-trihidroxi flavanona-5-glucósido- $[-2-^{14}\text{C}]$ en biochanina A y formononetina en brotes de chana. Se comprobó que el compuesto levógiro, fue incorporado 14 veces mas que el compuesto dextrógiro (Patschke et.al., 1966b). Este resultado muestra la estereoespecificidad de la vía flavanona natural-isoflavona, con el mismo grado de sustitución en el anillo A.

Los resultados comentados hasta ahora, muestran que la migración del grupo fenilo debe tener lugar en la etapa de un precursor $C_6-C_3-C_6$.

El reordenamiento in vitro de epóxidos de calcona adecuadamente sustituidos, conduce a isoflavonas. Sin embargo, este reordenamiento involucra la migración de un grupo benzofilo en lugar de un fenilo (House et.al., 1957; Grisebach y Barz, 1964) Figura 10.

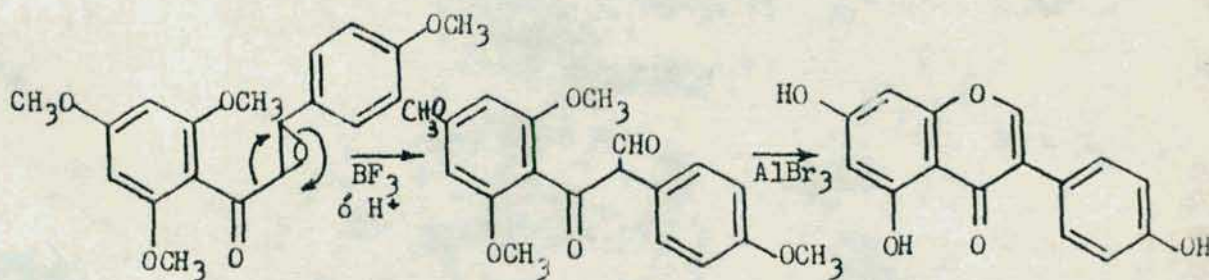


FIGURA 10

Brandner postuló que de acuerdo a la estructura trans H-2 (axial): H-3 (axial) de los dihidroflavonoles naturales, sería posible el desplazamiento C-2 \rightarrow C-3 del anillo aromático con la formación de un catión fenonio intermediario (Brandner, 1962) Figura 11.

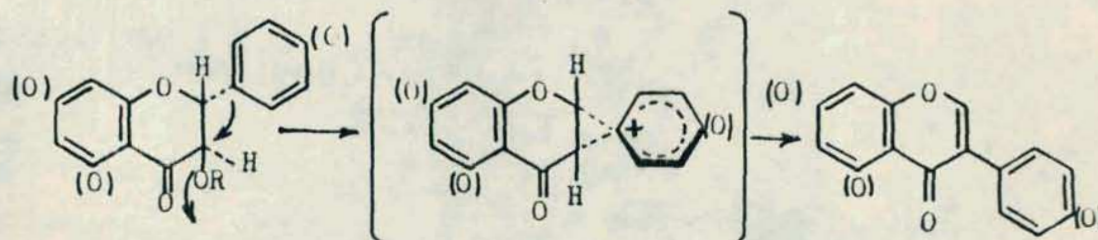


FIGURA 11

Según este autor, la reacción se iniciaría in vivo por la eliminación de un grupo pirofosfato como anión, pero los esfuerzos para detectar ésteres fosfato de flavonoles en plantas, no fueron exitosos hasta ahora.

Para probar la posibilidad si el reordenamiento a isoflavonas, tiene lugar en la etapa de dihidroflavonol, Barz et.al., (1965) administraron dihidrocanferol tritiado con y sin la adición simultánea de fenil alanina-[1- ^{14}C] a brotes de chana, y determinaron la incorporación en isoflavonas. En experimentos paralelos, también se administró canferol tritiado a dichos brotes (Barz y Grisebach, 1966). Los valores encontrados mostraron que la incorporación de dihidrocanferol y canferol, fue insignificante y poco específica.

De acuerdo a las experiencias anteriores, como las flavonas pueden excluirse como precursores de isoflavonas, y las flavanonas son

precursores muy eficientes, Grisebach concluyó que el reordenamiento a isoflavonas debe ocurrir en la etapa de flavanona.

El reordenamiento químico de una flavanona a una isoflavona, se llevó a cabo con tetraacetato de plomo, y se consideró una reacción que procede por radicales libres (Cavill *et.al.*, 1954). Un mecanismo hipotético para el reordenamiento de una flavanona *in vivo*, propuesto por Geissman y aun no demostrado, sería la oxidación de un tautómero enólico según se indica en la Figura 12.

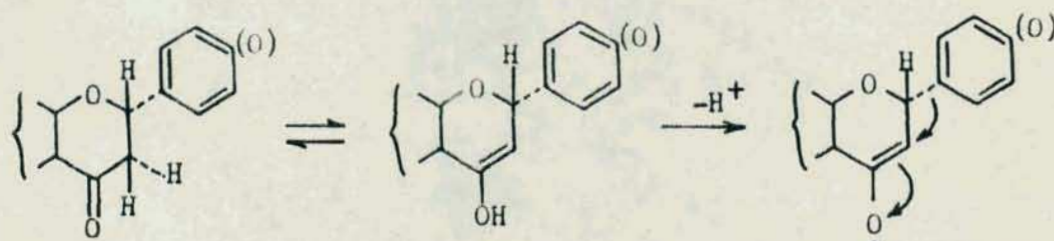
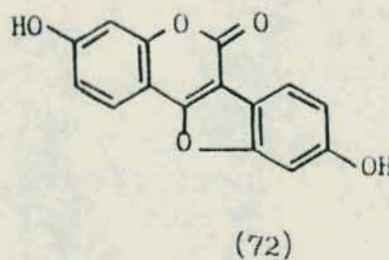
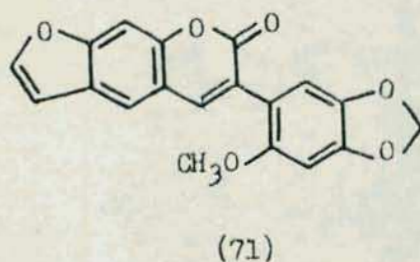


FIGURA 12

BIOSINTESIS DE 3-ARIL CUMARINAS

La 3-aril cumarina pachirricina (71), y un número de cumarano-cumarinas (p.ej. cumestrol (72)), se aislaron de la familia de las Leguminosas.



Sobre la base de fundamentos bioquímicos y taxonómicos, se postuló que la biosíntesis de estos compuestos, está relacionada a la de isoflavonas, en lugar de cumarinas (Grisebach, 1967; Bate-Smith, 1959).

Los experimentos realizados sobre biosíntesis del cumestrol, por Grisebach y Barz (1963, 1964) en alfalfa (Medicago sativa), demostraron que estas hipótesis eran correctas.

La administración de ácido cinámico- $[3-^{14}\text{C}]$, ácido acético- $[1-^{14}\text{C}]$ y 2',4,4'-trihidroxicalcona-4'-glucósido- $[\beta-^{14}\text{C}]$ mostró una incorporación como era de esperar para el caso de isoflavonas como precursores. Figura 13.

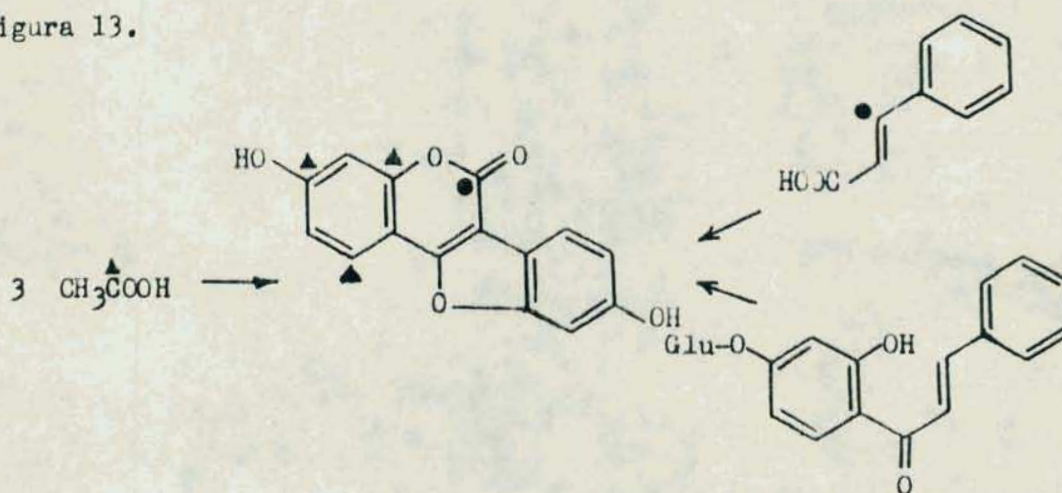
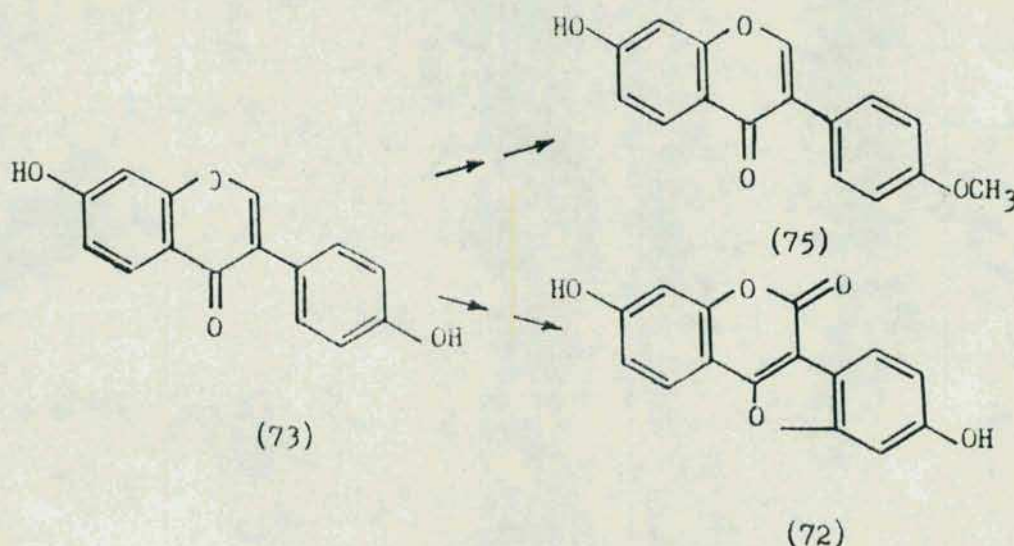


FIGURA 13

Estos resultados condujeron a la conclusión que el precursor común eran las calconas. Quedaba por determinar si el cumestrol se formaba a partir de una isoflavona (por ej. por oxidación del C-2), o si el cumestrol y las isoflavonas se formaban independientemente de un precursor común.

Barz y Grisebach (1966), investigaron la transformación de

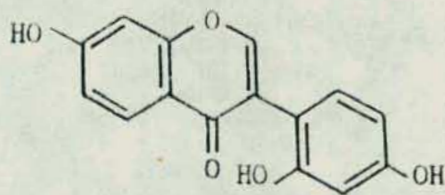
daidzeína (73) marcada con tritio (7,4'-dihidroxi isoflavona) en cumestrol (72) y formononetina (75) en alfalfa. Se uso D,L-fenil alanina-[CO- 14 C] como standard interno.



Los resultados demostraron que la daidzeína es un precursor de cumestrol, mejor que la fenil alanina, ya que la relación T/ 14 C en el cumestrol aumentó casi tres veces. En comparación, la incorporación de daidzeína en formononetina, fue algo menor que la de fenil alanina. Se hallaron actividades similares en cumestrol y formononetina, que mostraron que la velocidad de biosíntesis de ambos compuestos era similar. Estos resultados prueban que el cumestrol proviene de oxidación de daidzeína.

Experimentos mas recientes en Phaseolus aureus sobre la conversión de daidzeína en cumestrol, indicaron que sería intermediario en la misma, la 2'-hidroxidaidzeína (76) que es reducida a isoflavanona,

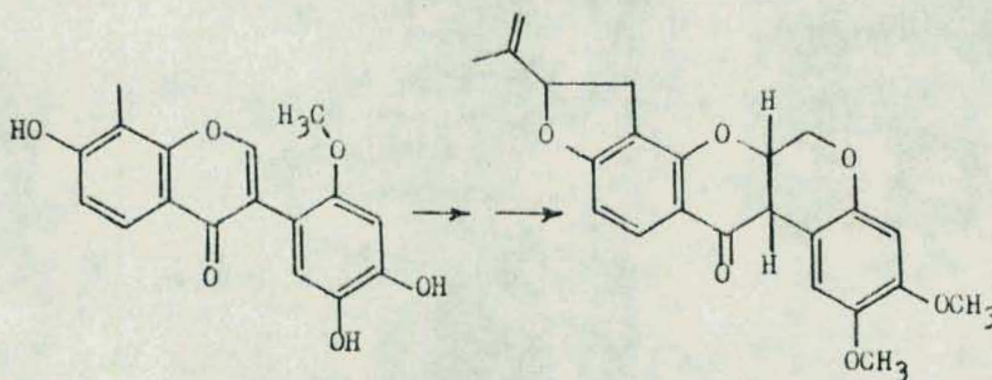
ciclada y oxidada para dar (72) (Dewick *et.al.*, 1970).



(76)

BIOSINTESIS DE ROTENCIDES

Un número limitado de metabolitos secundarios, parece formarse por caminos que involucran la ciclación oxidativa de grupos $-OCH_3$ sobre un átomo de carbono. Así se determinó la estructura de los rotenoides (rotenona, (78)), cuyo esqueleto carbonado básico es el de una isoflavona, modificada por la presencia de un átomo de carbono adicional, el cual proviene del grupo CH_3-S- de metionina, como fue demostrado en experiencias con precursores marcados (Crombie y Thomas, 1965).



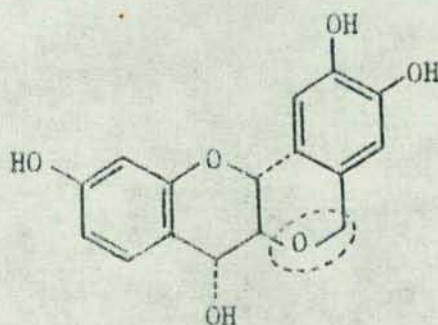
(77)

(78)

Este resultado sugiere que el camino de biosíntesis de la rotenona involucra en alguna etapa la ciclación de un grupo $2'-OCH_3$ de un precursor isoflavona. La idea de relacionar los rotenoides con isoflavonas, provino de que en algunas Leguminosas se encontraron estos dos tipos de compuestos con el sustituyente requerido.

Crombie y sus colaboradores, determinaron posteriormente (1970, 1971) el camino biosintético completo de calcona a rotenoides, en brotes de una Leguminosa (Amorpha fruticosa), corroborando las hipótesis previamente enunciadas.

De una manera análoga a la descrita, el peltogynol (79) es un compuesto flavonoide encontrado en Peltogyna porphyrocardia (Leguminosa) y representa un producto natural que contiene elementos estructurales (en un círculo) similares a los mencionados.



(79)

BIOSINTESIS DE AURONAS

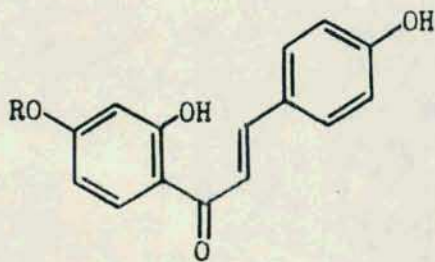
El número de auronas de ocurrencia natural, es relativamente pequeño, y limitado a ciertas especies de vegetales (Shimokoriyama, 1962).

Casi siempre las auronas o los glicósidos correspondientes, están

acompañados por la calcona de estructura análoga, lo que sugirió una relación biogenética próxima entre ambas clases de compuestos (Shimokoriyama y Hattori, 1953a; Geissman et.al., 1956; Shimokoriyama, 1957).

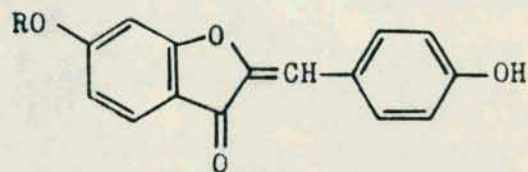
La conversión enzimática in vitro de calconas a auronas no marcadas, fue demostrada por Shimokoriyama y Hattori (1953b) usando extractos enzimáticos de flores de especies de Cosmos y Coriopsis.

Posteriormente Wong (1966a), empleando precursores marcados, corroboró las evidencias anteriores, ya que demostró, en brotes de soya (Soja hispida), la conversión bioquímica de isoliquiritigenina (42) y su 4'-glucósido (80) en 4',6-dihidroxiaurona (hispidol) (81) y en hispidol-6-glucósido (82).



(42) R = -H

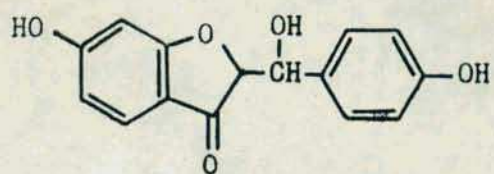
(80) R = -Glu



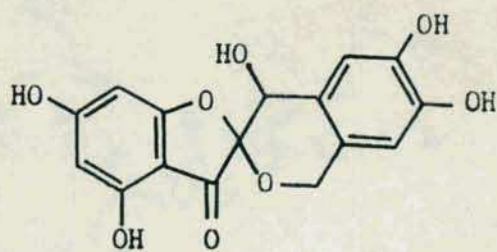
(81) R = -H

(82) R = -Glu

En cuanto al mecanismo, Wong sugirió que cumaranonas tales como (83) fueran intermediarios de transformación de calcona en aurona, y es apropiado señalar que una estructura relacionada (84), con un átomo de carbono mas, se aisló recientemente de madera de Acacia crombei.



(83)



(84)

V. EL TRITERPENO GERMANICOL

INTRODUCCION

El germanicol, del grupo del oleanano, es de distribución relativamente limitada en la Naturaleza, cuando se lo compara con otros representantes de la misma serie, por ejemplo β -amirina, taraxerol, ácido morólico.

Fue aislado por primera vez por Simpson (1944) de Lactuca virosa de la familia de las Compuestas, y a pesar que esta familia ha sido notablemente estudiada en los últimos tiempos, no se han encontrado otras especies de la misma que lo contengan.

Una revisión bibliográfica basada en el Chemical Abstracts, y en la publicación especializada Phytochemistry, que abarca hasta los primeros meses del año 1975 (Tabla 1), permite observar, que hasta este momento se ha encontrado principalmente en varias especies de la familia de las Euforbiáceas. Sólo recientemente, se encontró al germanicol en especies de Sarcostemma, que pertenece a la familia de las Asclepiadáceas (Keeton y Keogh, 1975), y se unen a las excepciones indicadas en la Tabla 1, donde figuran dos especies de Strychnos (Loganiáceas).

Puede observarse, como ocurre con muchos triterpenos, que se aisló también germanicol, esterificado con ácidos orgánicos diversos, principalmente alifáticos. Como se puede ver en la Parte Experimental, en el caso de nuestro trabajo con las especies de Morrenia, se obtuvo

TABLA 1

Aislamiento del germanicol y sus ésteres

FAMILIA	GENERO Y ESPECIE	COMPUESTOS	REFERENCIAS
Compuestas	<i>Lactuca virosa</i>	germanicol	Simpson (1944).
Euforbiáceas	<i>Euphorbia balsamifera</i>	germanicol	Dupont y Julia (1947)
Euforbiáceas	<i>Euphorbia balsamifera</i>	germanicol	González y Mora
		— éster(?)	(1952).
Loganiáceas	<i>Strychnos psilosperma</i>	germanicol	Anet <u>et.al.</u> (1953).
	<i>Strychnos arborea</i>	germanicol	
Euforbiáceas	<i>Euphorbia candelilla</i>	germanicol	Estrada (1956)
	var. <i>luxurians</i>	epigermanicol	
Euforbiáceas	<i>Youngia denticulata</i>	germanicol	Takemoto <u>et.al.</u>
		— acetato	(1966)
Euforbiáceas	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	germanicol	Khastgir y Pradham (1967).
Euforbiáceas	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	germanicol	Domínguez <u>et.al.</u> (1967).
Euforbiáceas	" <i>folium rosmarini</i> "	— acetato	Sendra <u>et.al.</u> (1969)
Euforbiáceas	<i>Elaterriospermum tapos</i>	germanicol	Chow y Quon (1970).
		— acetato	
		— palmitato	
Asclepiadáceas	Especies de <i>Sarcostemma</i>	germanicol	Keeton y Keogh
		— acetato	(1975).
		— butirato	
Asclepiadáceas	Especies de <i>Morrenia</i>	germanicol	Esta Tesis.
		— acetato	
		— cinamato	

por primera vez, el éster del germanicol con el ácido trans cinámico, que hasta ahora no había sido aislado en otras especies vegetales.

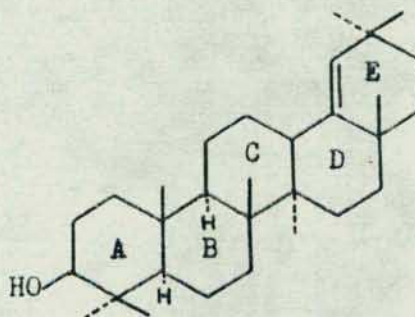
AISLAMIENTO

El látex seco de Lactuca virosa L. (Compuesta), que contiene una mezcla de ésteres triterpénicos, fue estudiado por varios investigadores desde fines del siglo pasado, los cuales no llegaron a obtener ningún producto puro (ver antecedentes en Simpson, 1944).

En 1944, Simpson, examinó nuevamente el insaponificable de esta planta, y aisló varios triterpenos cristalinos ya conocidos (taraxasterol, β -amirina), y además uno nuevo, al cual denominó germanicol.

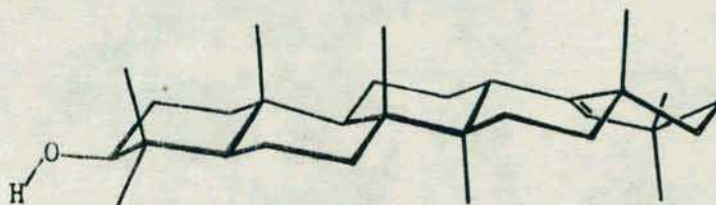
Simpson estableció su fórmula molecular correcta, $C_{30}H_{50}O$, señaló la presencia de una doble ligadura (reacción positiva con tetranitrometano), y de una función alcohol, puesto que pudo preparar su acetato y benzoato.

Como se relata mas adelante, varios autores demostraron que el germanicol (olean-18-en-3- β -ol) tiene la estructura (85).



(85)

Los estudios efectuados hasta el presente sobre conformaciones, por distintos métodos químicos y físicos, que incluyen el grupo del oleanano, permite considerar que este debe tener una conformación (86), basado en modelos Dreiding, en la cual lo mas importante es establecer la deformación que pueda tener la semisilla en el anillo E,



(86)

por influencia de la doble ligadura.

Los anillos A, B y C son silla todo trans, y el D es una silla modificada por acción de la doble ligadura mencionada.

DETERMINACION ESTRUCTURAL

Posteriormente al trabajo de Simpson, Dupont y Julia (1947), estudiando resinas de Euforbiáceas, aislaron de la Euphorbia balsamifera un único triterpeno, que por sus constantes físicas, y las de su acetato y benzoato, identificaron como el germanicol de Simpson.

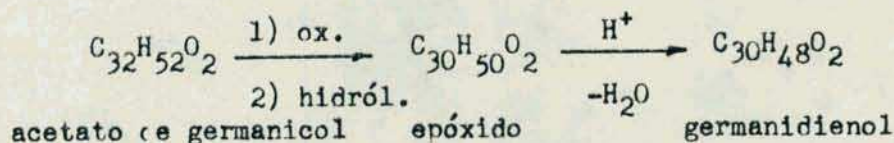
Además demostraron que la función alcohólica era secundaria, puesto que por oxidación con ácido crómico, daba una cetona, que sólo pudieron caracterizar por su dinitro fenil hidrazona.

Unos años después, David (1950), redujo la germanicona con distintos catalizadores, obteniendo nuevamente germanicol, y otra sustancia que se diferenció del mismo, por inversión de la quiralidad en el carbono 3. Esta nueva sustancia, en la cual el hidroxilo estaba en posición α fue denominada epi-germanicol.

El estudio de la estructura del germanicol fue retomado por David (1949), el cual confirmó la existencia de una sola doble ligadura, que fue resistente a la hidrogenación catalítica con óxido de platino, y a la oxidación con permanganato.

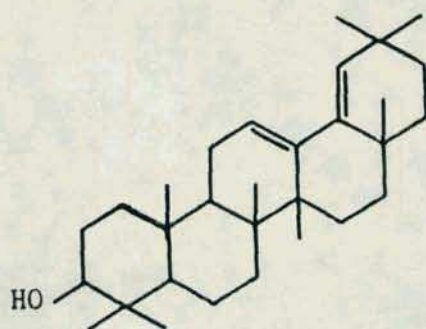
En cambio, el acetato de germanicol, tratado con ácido perbenzoico, dio el éster acético de un epóxido de fórmula $C_{30}H_{50}O_2$.

El ciclo epóxido pudo abrirse en medio ácido, y directamente se obtuvo un producto de deshidratación, de fórmula $C_{30}H_{48}O$, que David denominó germanidienol (el posible glicol intermediario, no pudo ser aislado), pues por dosaje con ácido perbenzoico, se comprobó la presencia de dos doble ligaduras conjugadas, y su espectro ultravioleta indicó que estaban colocadas en ciclos distintos ($\lambda_{\text{máx.}}$ 250 nm, log. ϵ 4,4 ; Woodward, 1941, 1942).

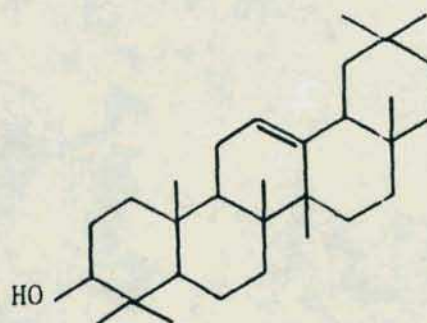


David asignó al germanidienol la estructura (87), porque resultó idéntico a un dieno obtenido por Ruzicka et.al. (1939), a partir de β -amirina (88), cuya estructura determinaron sin lugar a dudas.

Para tratar de precisar la posición de la doble ligadura inicial, David oxidó el acetato de germanicol, con dióxido de selenio en solu-



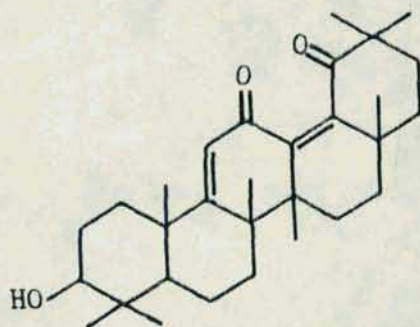
(87)



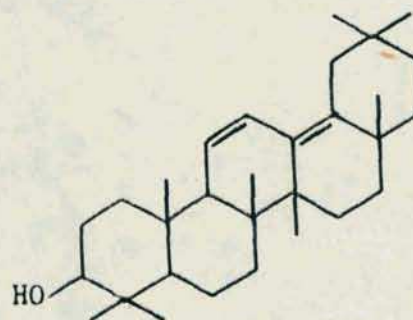
(88)

ción acética. Por cromatografía separó dos productos de oxidación, uno de los cuales resultó ser idéntico al acetato de olean-9,13-dien-12,19-diona (89), obtenido por Ruzicka (1941). Por lo tanto confirmó nuevamente la identidad de los dos esqueletos.

El otro producto contenía dos dobles ligaduras, las cuales por su espectro ultravioleta, eran conjugadas y situadas en ciclos distintos. Sus propiedades físicas, eran, sin embargo diferentes a las del germanidienol (87), por lo que David le asignó entonces la estructura (90).

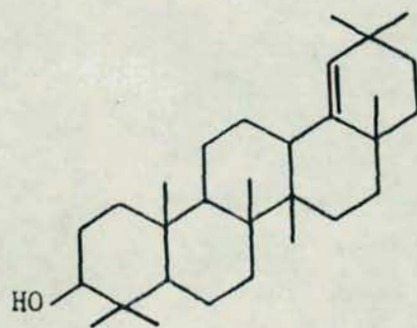


(89)

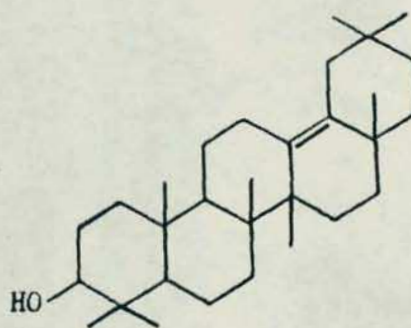


(90)

David, para explicar la formación del dieno indicado en (90), consideró que el germanicol debía poseer la estructura (91) ó (92).



(91)

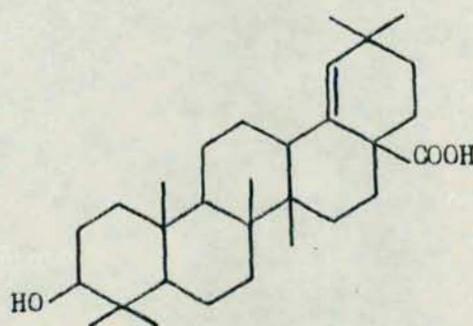


(92)

Prefirió la (91) porque no implicaba desplazamiento de la doble unión inicial, para dar el dieno (90), y la propuso para el germanicol.

La demostración final que la estructura del germanicol es la (91), fue realizada por Barton y Brooks (1950, 1951).

Estos autores, estudiaron una sapogenina triterpénica obtenida por hidrólisis de la saponina aislada por Farmer y Campbell (1950) de Mora excelsa, que fue denominada ácido morólico (93).



(93)

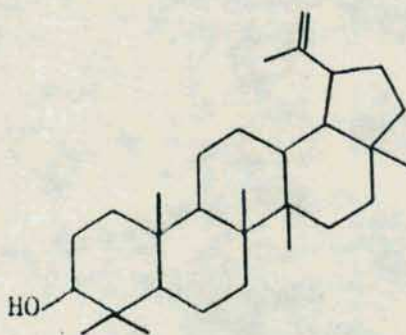
Al estudiar la química del ácido morólico, transformaron su grupo

carboxilo en metilo, por reacciones bien conocidas, y encontraron que era idéntico al germanicol. Como ya habían establecido en forma que no dejaba dudas, la posición de la doble ligadura en el ácido morólico, esta quedó también determinada para el germanicol, pues las reacciones que transforman al grupo carboxilo en metilo, no determinan habitualmente desplazamientos de la doble ligadura.

Las reacciones para la transformación de ácido morólico en germanicol, se indican en forma abreviada en la Figura 14.

Poco después, Ames et.al. (1951) y Halsall et.al. (1952), demostraron que el isolupeol era idéntico al germanicol.

El isolupeol, había sido preparado por Duerden et.al. (1939), tratando el lupeol (94) con ácido clorhídrico. Halsall et.al. explicaron el mecanismo de esta transformación, por un reordenamiento del tipo



(94)

Wagner-Meerwin (Figura 15).

Hace pocos años, Ireland et.al. (1970), realizaron una síntesis total del germanicol racémico, que requirió 31 etapas, y que dio un compuesto de punto de fusión 220-223° (germanicol natural, p.f. 176-177°), cuyos espectros I.R. y de R.M.P. coincidieron con los del producto natural.

TRANSFORMACION DE ACIDO MOROLICO EN ACETATO DE GERMANICOL

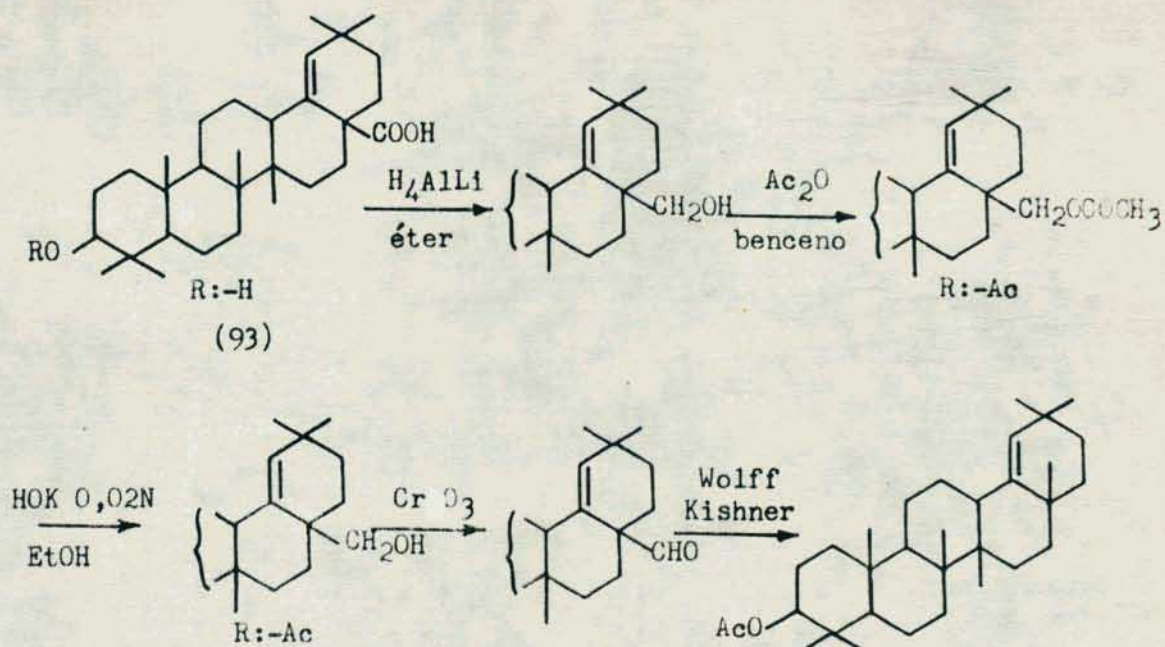


FIGURA 14

TRANSFORMACION DE IUPEOL EN GERMANICOL

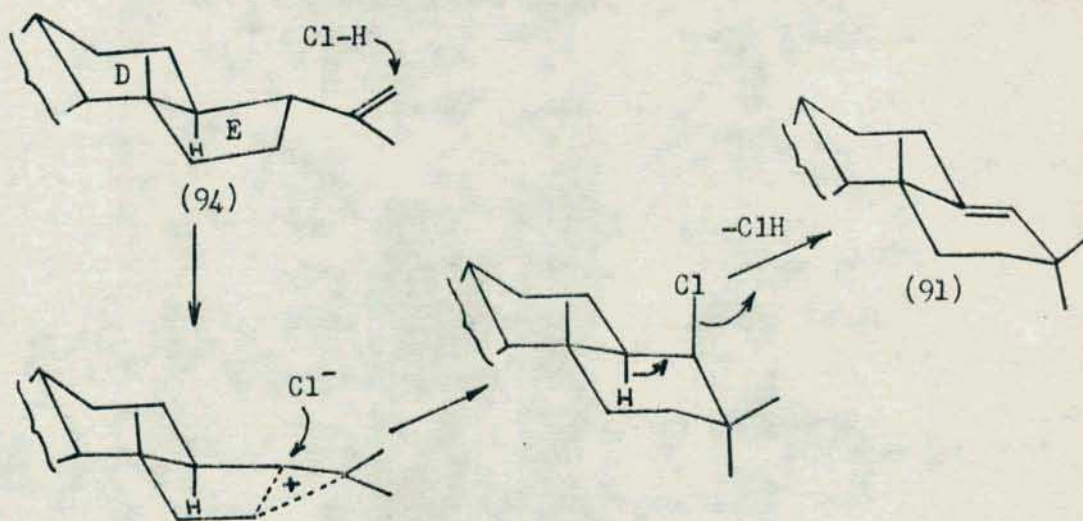


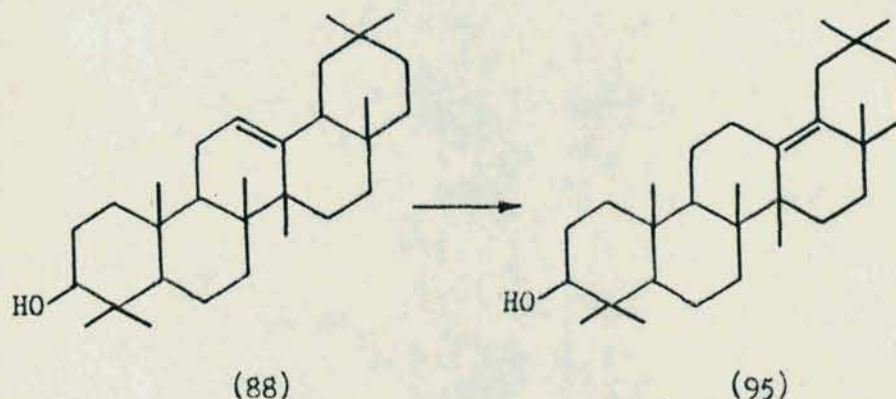
FIGURA 15

OTROS ASPECTOS QUIMICOS DEL GERMANICOL

Además de las reacciones discutidas anteriormente, que sirvieron para determinar la estructura del germanicol, se han estudiado otros aspectos químicos del mismo.

La presencia de una doble ligadura, indujo a compararlo con las reacciones que otros triterpenos pentacíclicos dan por tratamiento en medio ácido.

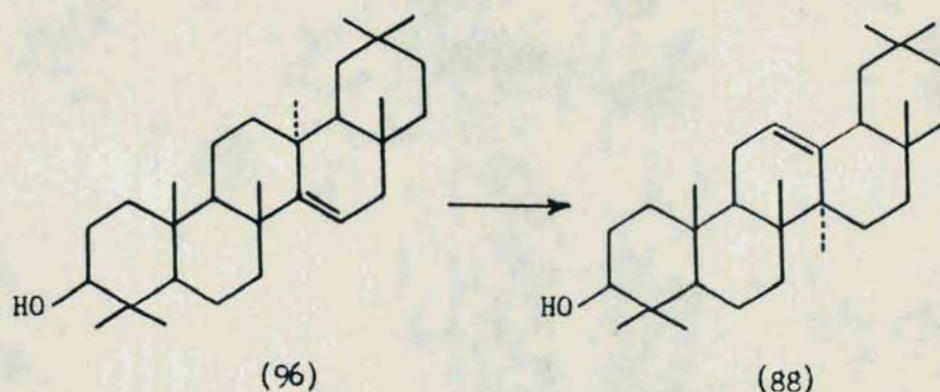
Algunos de los antecedentes mas importantes son los de Ruzicka et.al. (1941, 1942), que describieron la transformación de la β -amirina (88) en otro isómero natural, la δ -amirina, (95) según



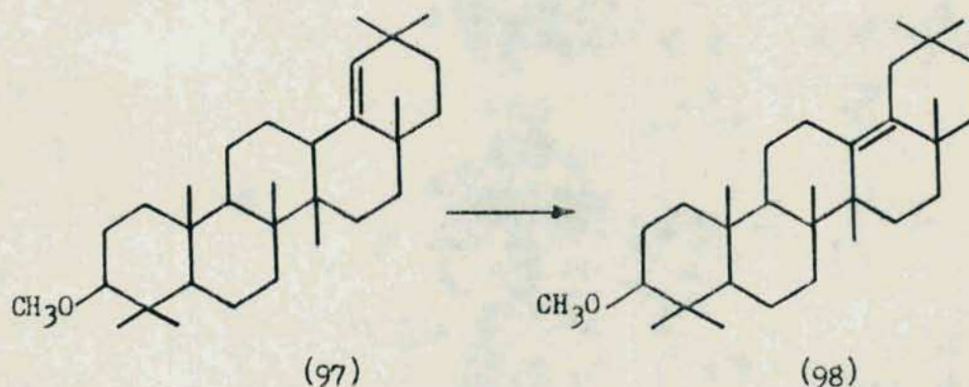
Posteriormente, se describió también la transformación de taraxerol (96) en β -amirina (88) (Beaton et.al., 1955) que implicaba no sólo la migración de la doble ligadura, sino también la transferencia de un grupo metilo de carbono-13 a carbono-14.

Una migración similar de la doble ligadura, fue realizada por Abe (1960) a partir de la miliacina (97), éter metílico triterpénico aislado de Panicum miliaceum (Gramínea). El tratamiento de este producto

con reactivos ácidos, condujo a la 3- β -metoxi- δ -amirina (98).



Un estudio de la reacción anterior con el germanicol, había sido realizado ya por González y Mora (1952) sobre productos aislados de Euphorbia balsamífera. La acción directa del ácido clorhídrico sobre



este compuesto, les dio una sustancia de punto de fusión 219-220°. Efectuaron un tratamiento similar sobre acetato de germanicol, y obtuvieron cristales de punto de fusión 204-205° que por hidrólisis alcalina dio un compuesto que debiera ser un alcohol, y que tenía el mismo punto de fusión (204-205°).

En base a los hechos mencionados, nosotros realizamos algunas tentativas para lograr la migración de la doble ligadura del germanicol,

a la posición termodinámicamente mas estable, entre los carbonos 13 y 18, debiendo obtenerse la δ -amirina (95).

Se efectuaron experiencias con germanicol y su acetato, empleando condiciones similares a las de Gonzáles y Mora (1952). (Acido clorhídrico 3% en solución de ácido acético glacial y calentamiento a 80° durante una hora). En todos los casos se obtuvo una sustancia que hidrolizada dio un producto de punto de fusión 203-205°, posiblemente idéntico al obtenido por Gonzáles y Mora, pues no pudo efectuarse una comparación directa.

Se hicieron además, transformaciones en otras condiciones, por ejemplo con ácido clorhídrico en ácido acético en tubo cerrado, a distintas temperaturas; burbujeando cloruro de hidrógeno (gaseoso) en una solución clorofórmica de germanicol, durante distintos períodos, y luego dejando estacionado una semana. Cuando los productos de transformación, homogéneos en cromatografía en capa delgada, aun con nitrato de plata, se estudiaron por cromatografía gas-líquido, se encontró que eran mezclas con el producto inicial, que no pudieron separarse por cristalizaciones repetidas, ni cromatografía líquida.

No hemos podido obtener un testigo de δ -amirina para comparar con los productos de la transformación, y actualmente se continúa estudiando esta migración de la doble ligadura del germanicol y sus derivados.

BIOSINTESIS DE TRITERPENOS PENTACICLICOS

Como resultado de los extensos estudios sobre biosíntesis de esteroides y triterpenos, actualmente se reconoce al escualeno como un metabolito secundario universal precursor de los mismos.

Su conversión por ciclación en distintos tipos de triterpenos, explica la biosíntesis de los compuestos triterpenoides de origen natural (Ruzicka, 1953).

En base a los estudios con precursores marcados con isótopos radiactivos, se demostró la biosíntesis del escualeno, según el camino: acetil coenzima A \rightarrow ácido mevalónico \rightarrow pirofosfato de geranilo \rightarrow \rightarrow pirofosfato de farnesilo, y la unión cola-cola de dos unidades de éste último, dieron escualeno (Rees y Goodwin, 1972 y referencias ahí citadas).

El paso previo a la ciclación del escualeno, es la formación del 2,3-óxido del mismo, por enzimas epoxidasas (Tai y Bloch, 1972; van Tamelen, 1968).

Luego ocurre la ciclación, según una serie de pasos secuenciales catalizados por enzimas ciclasas, para dar un catión (100) Figura 16. (Rees y Goodwin, 1972).

Si el ion carbonio intermediario, formado en la ciclación inicial del escualeno, reacciona con la doble ligadura de la cadena lateral, se forma un quinto anillo, dando origen a la serie de triterpenos pentacíclicos. (102), Figura 16.

Barton et.al. (1971) propusieron varios mecanismos para la biosín-

tesis de β -amirina y germanicol. Cuando trataron de demostrar sus hipótesis, en base a estudios con precursores marcados, estos no se confirmaron.

La distribución de ácido mevalónico en los triterpenos, podía explicarse en base a las reglas propuestas por Ruzicka (1953) y Eschenmoser et.al., (1955) quienes indicaron que la biosíntesis de triterpenos pentacíclicos procedía según lo indicado en la Figura 16.

El germanicol, se produciría a partir del catión indicado en (105) por pérdida de un átomo de hidrógeno y formación de la doble ligadura. Por desplazamientos de la carga, se podrían formar otros triterpenos, como β -amirina (88).

Recientemente, Seo et.al., (1975) estudiando la formación de compuestos de la serie del oleanano y ursano, a partir de ácido mevalónico- $[4-^{13}\text{C}]$ verificaron experimentalmente la hipótesis para la ciclación del 2,3-óxido de escualeno, ya mencionada.

BIOSINTESIS DE TRITERPENOS PENTACICLICOS DE LA SERIE DEL OLEANANO

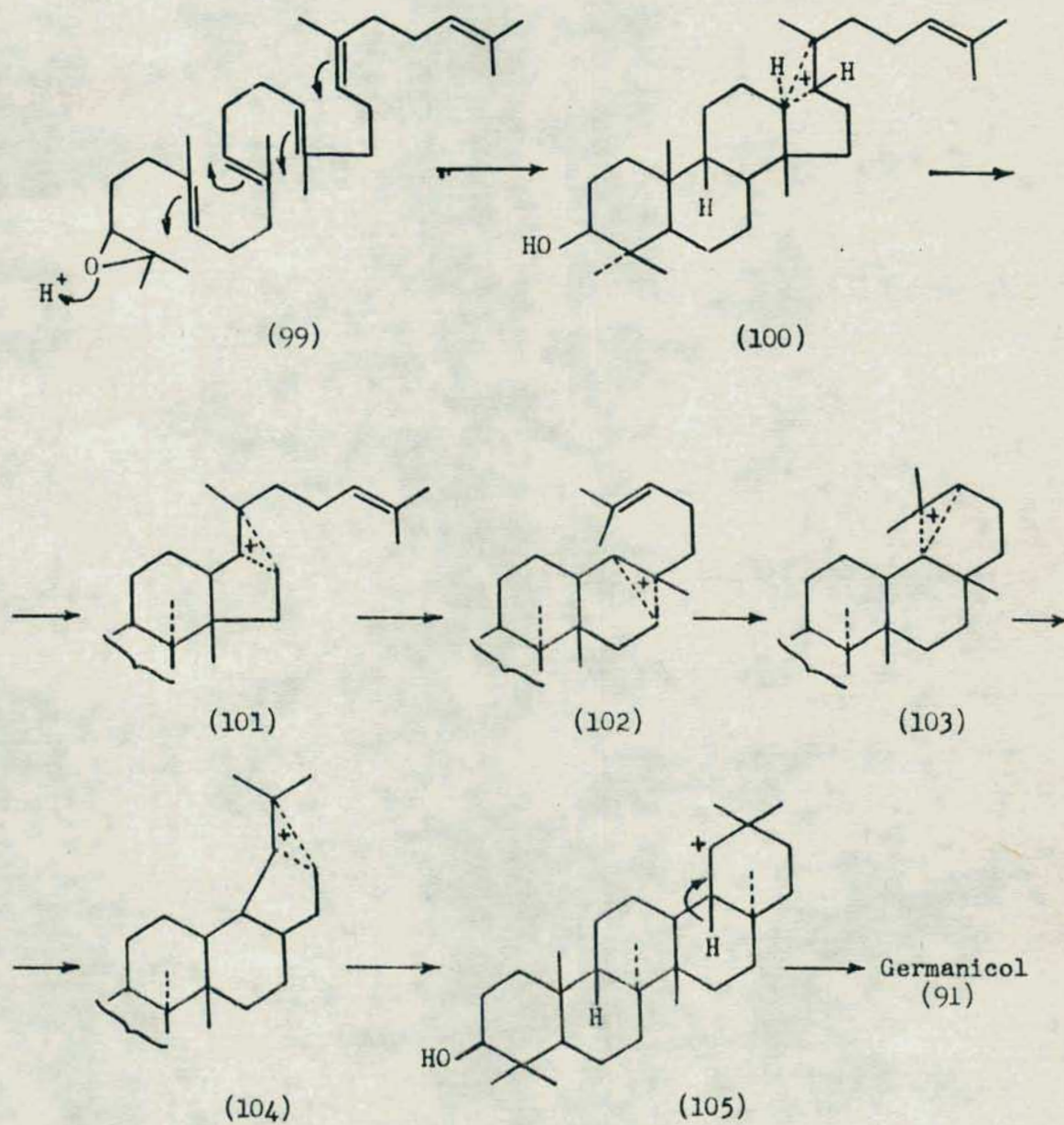


FIGURA 16

VI. RESULTADOS OBTENIDOS

A. EXTRACTO EN ÉTER DE PETRÓLEO

Los extractos en éter de petróleo, dieron en cromatografía en capa delgada, varias manchas con distintos valores de R_f , cuyo fraccionamiento, como se indica en la Parte Experimental, condujo a tres tipos de compuestos: hidrocarburos, triterpenos y esteroides.

Hidrocarburos alifáticos. M. brachystephana.

De las primeras fracciones de la cromatografía en columna de sílica gel, del extracto en éter de petróleo, que se eluyeron con este mismo solvente, se aisló un sólido blanco cristalino, no reactivo frente a distintos reactivos cromogénicos, de p.f. 60-65°. Recristalizado de benceno-metanol, dio láminas brillantes de p.f. 65-67°.

Su análisis elemental, indicó la ausencia de sustituyentes oxigenados, y en su espectro de absorción ultravioleta, no hubo absorción en la zona 280-450 nm. El espectro de absorción infrarroja del sólido mostró bandas en las zonas características de compuestos hidrocarbonados; en su espectro de R.M.P. hubo dos únicas señales a 0,89 y 1,26 ppm correspondientes a metilo y metileno alifáticos respectivamente, en relación aproximada 1:10.

En base a los datos anteriores, se determinó la presencia de hidrocarburos alifáticos de cadena larga, cuya presencia es característica de algunas especies vegetales. Para este tipo de compuestos,

el punto de fusión no es suficiente criterio de pureza, ya que variaciones sustanciales en la longitud de la cadena, no modifican sensiblemente dicha constante física.

El empleo de la cromatografía en fase gaseosa, y mediante el uso de compuestos patrones de 28, 30 y 32 átomos de carbono permitió determinar que se trataba de una mezcla de hidrocarburos lineales.

Haciendo uso del gráfico que resulta de representar el logaritmo del tiempo de retención ($\log Tr$) en función del número de átomos de carbono (para operación isotérmica), se verificó que estos componentes pertenecen a una serie homóloga, con preponderancia de aquellos de número de átomos de carbono impar, siendo el mas importante el hentriacontano ($C_{31}H_{64}$).

En todas las especies de *Morrenia* estudiadas, el contenido y proporción de hidrocarburos fue similar, y se analiza en lugar aparte frente a posibles relaciones quimiotaxonómicas.

Triterpenos. *M. brachystephana*.

En los ensayos preliminares, ya se vio que había productos que daban positiva la reacción de Liebermann-Burchard. Los extractos en éter de petróleo, dieron en cromatografía en capa delgada, varias manchas con distintos valores de R_f , que se visualizaron con el revelador óleum en ácido acético, que da manchas violeta rojizo, característico de compuestos terpenoides.

El fraccionamiento cromatográfico del extracto, previo a la

hidrólisis, dio en las fracciones 8-18, una mezcla de dos productos (Rf 0,65 y 0,56, sílica gel, cloroformo), que fueron separados mediante cromatografía en columna.

El componente mas abundante (Rf 0,65), recristalizado de acetato de etilo hasta punto de fusión constante, dio un producto cristalino blanco de p.f. 249-250°, $[\alpha]_D^{18}$: +8,65, cuyo análisis elemental correspondía a una fórmula $C_{39}H_{56}O_2$. Este compuesto dio positiva las reacciones coloreadas habituales de los triterpenos, incluyendo el ensayo con ácido tricloroacético que los diferencia de los esteroides.

El espectro de absorción ultravioleta mostró un máximo a 278 nm ($\log \epsilon = 4,3$) que se pudo atribuir a un sistema tipo cinamóilo.

El espectro infrarrojo (Figura 21) mostró bandas a 1730, 1290 y 1190 cm^{-1} que se pueden asignar a un carbonilo de éster $\alpha-\beta$ no saturado, y la presencia de dos bandas intensas a 775 y 718 cm^{-1} indicaron un sistema aromático, posiblemente monosustituído.

En el espectro R.M.P. aparecen tres grupos de señales, uno a campos altos (0,7 a 1,2 ppm), otro en la zona media (4,7-5 ppm) y otro en la zona aromática (6,6-7,8 ppm). (Figura 22).

Las señales entre 0,7-5 ppm son compatibles con el esquema presentado por los triterpenos (Shamma *et.al.*, 1962) donde aparecen los metilos angulares y los hidrógenos de los metilenos; la señal a 4,73 ppm corresponde a un hidrógeno axial, sobre un carbono que contiene el grupo alcohol, y la señal a 4,95 ppm indica la presencia de un hidrógeno vinílico.

Las señales en la zona a campos bajos, es la propia del ácido cinámico, donde se observa el acoplamiento de los hidrógenos etilénicos en trans ($J = 16$ cps). El ácido trans-cinámico, previa hidrólisis del éster fue identificado por sus constantes físicas (p.f., p.f.m., equivalente de neutralización) y espectroscópicas (U.V., I.R. y R.M.P.).

El espectro de masa del éster triterpénico, dio un ion molecular de 556, mientras que para el alcohol obtenido de la hidrólisis básica el ion molecular fue 426, correspondiente a una fórmula $C_{30}H_{50}O$.

La concordancia de las constantes físicas (punto de fusión y poder rotatorio) de los derivados del alcohol, acetato, benzoato y de su producto de oxidación, con los correspondientes al germanicol, (Tabla 2) indicaron que el éster era el t-cinamato de germanicol, aun no aislado de fuentes naturales ni preparado sintéticamente.

TABLA 2

	p.f.	lit.	$[\alpha]_D$	lit.
t-cinamato de germanicol	249-250°	---	+ 8,65	---
germanicol	176-177°	176-177°	6,1	5,8 a
-- acetato	272-273°	274-276°	17,8	18,1 a
-- benzoato	263-265°	269-270°	37,2	39,0 a
germanicona	184-185°	185-186°	---	--- b

a) Simpson, 1944.

b) González y Mora, 1952.

La identificación final del germanicol, se hizo en base a la comparación directa con una muestra auténtica (punto de fusión mezcla, I.R. superponible); se analizaron además las frecuencias de resonancia de los metilos del espectro de R.M.P., y se interpretaron los fragmentos principales del espectro de masa, de acuerdo a los datos registrados en la literatura. (Ver mas adelante).

Producto de Rf 0,56. Este compuesto, separado del de Rf 0,65 (t-cinamato de germanicol) como se indica en la Parte Experimental, recristalizado de acetona, dio láminas triangulares cristalinas de p.f. 272-273°, $[\alpha]_D^{18} = +17,8$.

Su análisis elemental indicó una fórmula $C_{32}H_{52}O_2$. El espectro I.R. (Figura 23) mostró una señal intensa a 1730 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo de éster. El espectro R.M.P. presentó una señal a 2,03 ppm cuya integración dio 3 hidrógenos y que se asignó a acetato. (Figura 24). El espectro de masa dio un ion molecular 468.

El alcohol obtenido de la hidrólisis básica, fue identificado como germanicol, por sus constantes físicas y espectroscópicas.

La identificación final del éster (acetato de germanicol), se hizo por comparación con una muestra auténtica.

Fracciones 26-31. De la columna de cromatografía para la purificación del extracto en éter de petróleo (fracciones 26-31) se obtuvo un producto de Rf 0,30 (sílica gel, cloroformo), que recristalizado de acetato de etilo, dio agujas blancas de p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{18} = +6,3$ cuyas características físicas y espectroscópicas coincidieron con las de una muestra auténtica de germanicol.

HIDROLISIS DEL EXTRACTO TOTAL EN ÉTER DE PETRÓLEO

El extracto total en éter de petróleo, fue sometido a una hidrólisis básica, y luego de separar la parte acídica, la cromatografía en capa delgada del insaponificable mostró la presencia de sólo dos componentes. El mas importante de R_f : 0,30 (sílica gel, cloroformo), y otro de R_f : 0,18 (mismo sistema). El primero dio coloración violeta-rojiza y el segundo, verde-azulado frente al reactivo de Liebermann-Burchard.

La separación de ambos, se efectuó mediante una cromatografía en columna de sílica gel (Parte Experimental). De las fracciones 6-65 reunidas, se obtuvo un sólido que recrystalizado de acetato de etilo dio agujas blancas de p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{20} = +6,1$ que fue identificado como germanicol por sus espectros I.R. (Figura 25) y de R.M.P. (Fig. 26) y comparación con una muestra auténtica.

De las fracciones 116-140, se separó el producto de R_f 0,18 homogéneo en cromatografía en capa delgada, que recrystalizado de etanol dio agujas de p.f. 139-140°, $[\alpha]_D^{20} = -34,2$.

La pureza de este producto, al ser comprobada por cromatografía gas-líquido, mostró ser una mezcla de dos componentes en relación 18:82, cuya identificación como campesterol y sitosterol respectivamente, se hizo en base a la comparación con una muestra auténtica conteniendo ambos compuestos, y el estudio del espectro de masa de la mezcla.

La preparación del acetato del producto de p.f. 139-140°, condujo

a una mezcla de los acetatos de campesterol y sitosterol, que recristalizados de etanol dio agujas de p.f. 120-121°, $[\alpha]_D^{20} = -42$. la proporción de la mezcla, no pudo variarse por empleo de distintos solventes de cristalización.

Es conocido desde antes del empleo de la cromatografía gas-líquido que las muestras consideradas como sitosterol (antes denominadas β -sitosterol), estaban contaminadas con distintos esteroides (por ejemplo: brassicasterol, stigmasterol, campesterol, dihidrositosterol) (Elsevier, 1954).

Estos sitosteroles aislados de plantas, aun después de su purificación eran mezclas de sitosterol, donde prevalecía alguno de los compuestos antes mencionados, lo que dio origen a las denominaciones α -, β -, γ -, δ - y ξ -sitosterol.

El desarrollo de la cromatografía gas-líquido permitió asignar la composición de esas mezclas y realizar su separación (c.g.l. preparativa), por lo que actualmente empezaron a dejar de usarse los prefijos griegos que las caracterizaban.

Nishioka et.al., (1965) en muestras preparadas por este camino, dio un p.f. para sitosterol de 137-138° y $[\alpha]_D^{25} = -39$, valores próximos a los hallados para la mezcla 82:18 de sitosterol y campesterol.

Por su parte, Steele y Mosettig (1963) desarrollaron un método de separación de esta mezcla, basado en transformaciones químicas.

ESTUDIO DEL ESPECTRO DE MASA DEL PRODUCTO DE P.F. 139-140°

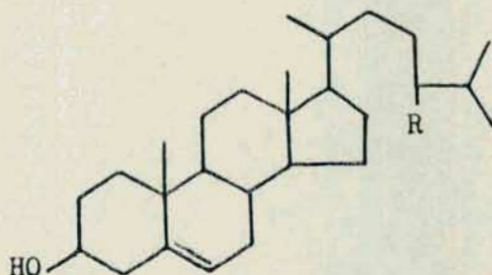
El espectro de masa del producto de p.f. 139-140° fue comparado con los de sitosterol y campesterol, aparecidos en el extenso trabajo de Knights (1967) sobre identificación de esteroides de plantas.

En la Tabla 3 se dan los datos comparativos dados por Knights y la mezcla aislada de M. brachystephana. (Para el cálculo de los porcentajes en este último caso, se tomaron como pico base, los dos mas importantes correspondientes a los respectivos iones moleculares).

TABLA 3

fragmento	sitosterol Knights	campesterol (1967)	sitosterol <u>M. brachystephana</u>	campesterol
M ion molecular	414(100)	400(100)	414(100)	400(100)
a M-CH ₃	399 (45)	385 (50)	399 (28)	385 (29)
b M-H ₂ O	396 (54)	382 (62)	396 (45)	382 (58)
c M-CH ₃ -H ₂ O	381 (42)	367 (50)	381 (36)	367 (30)
j M-H ₂ O-C ₅ H ₇	329 (50)	315 (60)	329 (41)	315 (40)
k M-H ₂ O-C ₇ H ₉	303 (70)	289 (65)	303 (44)	289 (50)
l M-H ₂ O-C ₉ H ₁₃	275 (18)	261 (20)	275 (15)	261 (18)
o M-H ₂ O-C ₈ H ₁₂	288	274 (14)	288	274 (29)
d M-c.l.*	273 (54)	273 (50)	273 (40)	
e M-c.l.-H ₂ O	255 (60)	255 (82)	255 (57)	
f M-c.l.-42	231 (58)	231 (44)	231 (38)	
g M-c.l.-42-H ₂ O	213 (78)	213 (74)	213 (55)	
h M-c.l.-27	246 (12)	246 (10)	246 (3)	
i M-c.l.-27-H ₂ O	229 (25)	229 (25)	229 (19)	

* c.l.: cadena lateral



R:-CH₃, campesterol

R:-C₂H₅, sitosterol

ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA DEL GERMANICOL Y DERIVADOS

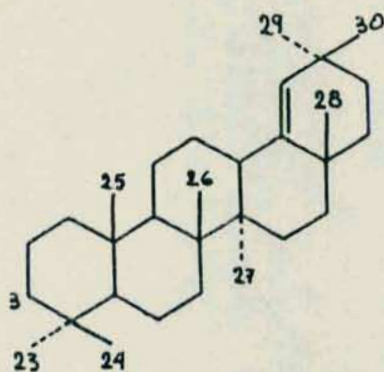
Los triterpenos pentacíclicos (como así también los que poseen cuatro anillos), constituyen un grupo de sustancias ampliamente difundidas en el Reino Vegetal. Todos ellos normalmente poseen ocho grupos metilo, que dan origen en el espectro R.M.P. a un grupo de señales bien definidas, cuya posición varía apreciablemente al introducir en la molécula sustituyentes con fuerte anisotropía, o que produzcan cambios en la conformación de la misma.

Varios autores se ocuparon de este tema en el campo de los triterpenos tetracíclicos (Hemmert et.al., (1966); Javarone et.al., (1970)) y pentacíclicos (Lehn y Ourisson, (1962); Tursch et.al., (1967); Cheung y Williamson, (1969) e Ito et.al., (1969)).

Más recientemente, González et.al., (1971) estudiaron la resonancia de los grupos metilo de una serie de derivados del Δ^{18} -oleaneno con cuyos valores se compararon las señales de los componentes hallados en este trabajo. Los valores consignados, concuerdan con los de González et.al., (1971), a los que se agregaron las señales correspondientes al cinamato de germanicol, sustancia aun no registrada en la literatura. Tabla 4.

TABLA 4

señales de metilos	23 C-4 α	24 C-4 β	25	26	27	28	29	30
germanicol	0,97	0,77	0,87	1,07	0,77	1,01	0,93	0,93
- acetato	0,85	0,85	0,90	1,10	0,73	1,00	0,93	0,93
- benzoato	0,96	0,74	0,90	1,07	0,74	1,00	0,92	0,92
- cinamato	0,97	0,75	0,85	1,12	0,75	1,03	0,92	0,92
- cetona	1,07	1,03	0,96	1,11	0,75	1,07	0,94	0,94



Numeración de los grupos metilo en el Δ^{18} -oleaneno.

ESPECTROS DE MASA DEL GERMANICOL Y SUS ESTERES

Las fragmentaciones fundamentales del acetato de germanicol y otros compuestos de la serie Δ^{18} -oleaneno, fueron discutidas por Budzikiewicz et.al. (1963). Posteriormente sólo Chow y Quor (1970) publicaron datos sobre el espectro de masa del acetato de germanicol.

Los fragmentos mas importantes de los espectros de masa del cinamato y acetato de germanicol, junto con los del alcohol libre aparecen en la Tabla 5 .

Todos los compuestos pertenecientes a la serie del Δ^{18} -oleaneno muestran una pérdida pronunciada de un metilo, posiblemente del C_{17} según Budzikiewicz et.al., como se esperaría por la activación alílica de la doble unión 18-19. Sin embargo no podrían excluirse cualquiera de los metilos unidos al C_{20} . Esto da origen a los fragmentos m/e 541, 453 y 411 para cinamato, acetato y germanicol respectivamente.

Los iones de m/e 337, 249 y 207 para la serie enunciada, provienen de la ruptura principal de este sistema de anillos, a través del ciclo C, donde el centro de insaturación no debe ejercer influencia por estar alejado, pero esta doble ligadura debe ayudar a la estabilización de los iones que contienen a los anillos D y E.

La ruptura del anillo C procede a través de una retro Diels-Alder (Figura 17) para dar el ion a, el que a su vez por pérdida del ácido correspondiente o agua, conduce a un ion m/e 189.

TABLA 5

FRAGMENTOS CARACTERISTICOS DE LOS ESPECTROS DE MASA DEL GERMANICOL Y
SUS ESTERES

	cinamato	acetato		alcohol
		esta Tesis	Chow y Quon	
M	556 (8)*	468 (85)	(25)	426 (35)
M - CH ₃	541 (4)	453 (26)		411 (22)
M - ROH	408 (7)	408 (9)		408 (5)
M - ROH - CH ₃	393 (8)	393 (10)		393 (3)
M - C ₁₆ H ₂₆	218 (25)	218 (93)		218 (69)
C ₁₅ H ₂₅	205 (37)	205 (43)	(45)	205 (51)
C ₁₅ H ₂₄	204 (100)	204 (100)	(100)	204 (100)
C ₁₅ H ₂₃	203 (18)	203 (31)		203 (35)
C ₁₄ H ₂₂	190 (25)	190 (18)		190 (22)
C ₁₄ H ₂₁	189 (83)	189 (59)	(77)	189 (94)
C ₁₃ H ₂₁	177 (60)	177 (56)	(78)	177 (89)
C ₉ H ₇ O	131 (92)			

* Los valores entre paréntesis indican porcentajes respecto al pico base.

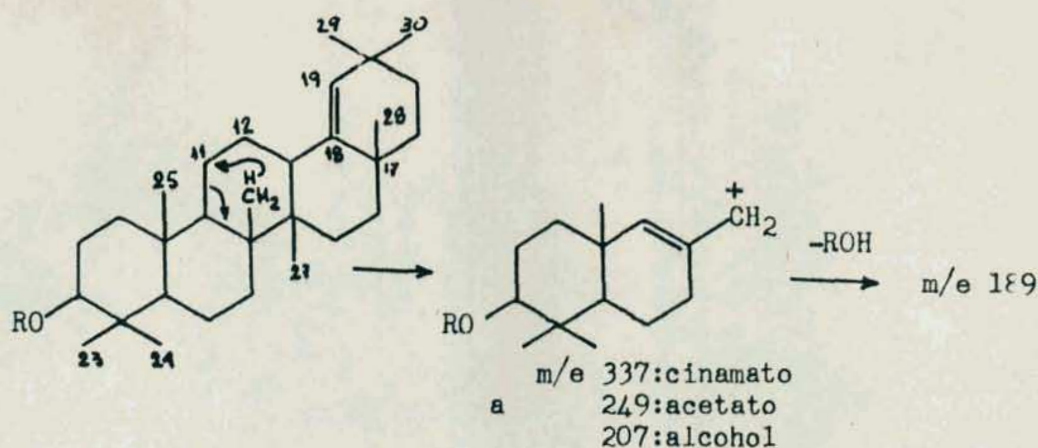


FIGURA 17

El ion $\text{m/e } 218$ se produce por el mismo tipo de ruptura, sin reordenamiento de hidrógeno y comprende a los anillos D y E. Este ion (b) puede estabilizarse según b' y puede perder un grupo metilo para dar b' ($\text{m/e } 203$). Figura 18.

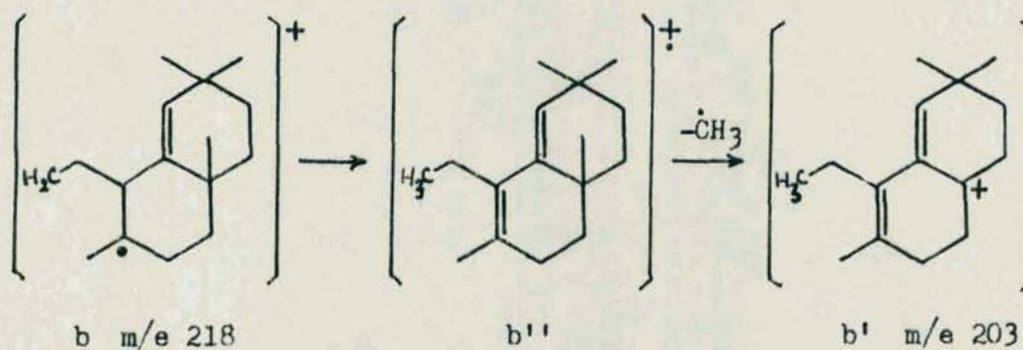


FIGURA 18

El pico base se origina de la ruptura de la unión 11-12 sin reordenamiento de hidrógeno (fragmento c, $\text{m/e } 204$), el cual puede reordenarse a la especie mas estable c''. La pérdida de un grupo metilo conduce nuevamente a un ion $\text{m/e } 189$ (d). Figura 19

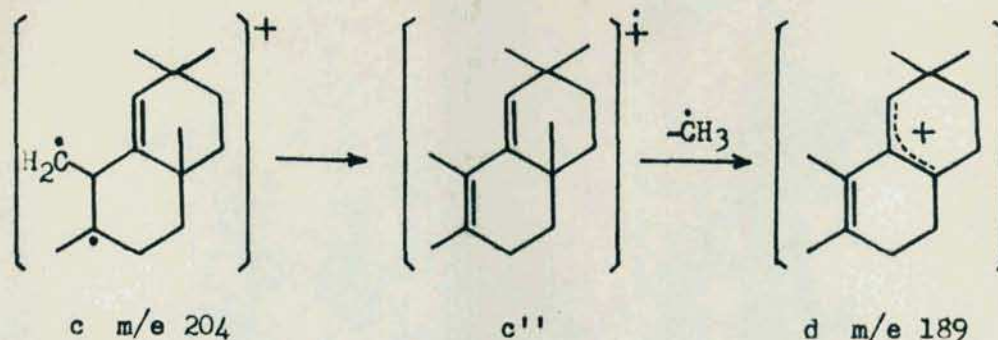


FIGURA 19

La ruptura de la unión 11-12 con reordenamiento de hidrógeno conduce a la especie m/e 205 (**c'**) que por pérdida de metilo conduce a la especie **d'**. Figura 20.

En todos los espectros aparece una señal importante a m/e 177 que puede corresponder a un ion $\text{C}_{13}\text{H}_{21}$. Según Budzikiewicz *et.al.*, el sustituyente del C_{17} tiene una influencia importante sobre el origen de este fragmento que provendría de una descomposición retro Diels Alder de la especie **c'** dando **e**. Figura 20.

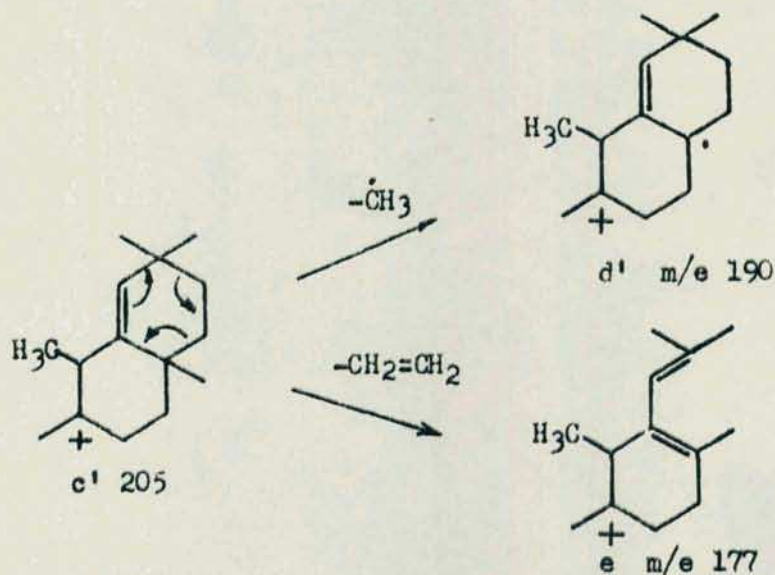


FIGURA 20

En el espectro de masa del cinamato de germanicol tiene importancia un ion m/e 131 correspondiente a un fragmento C_9H_7O , que tiene su origen en el resto cinámico.

B. EXTRACTO EN METANOL

El estudio preliminar de los extractos en metanol de las distintas especies de *Morrenia* estudiadas (hojas y tallos), se realizó por cromatografía bidimensional, y los resultados obtenidos están indicados en la Tabla 6

TABLA 6

	luteolina	glucoluteolina	isoquercitrina	rutina
<i>M. brachystephana</i>	+	+	+	+
<i>M. odorata</i>	+	+	+	+
<i>M. conectens</i>	+	+	+	+
<i>M. stuckertiana</i>	-	+	+	+
<i>M. schulziana</i>	-	-	+	+
<i>M. stormiana</i>	-	-	+	+

Para las tres primeras especies (*M. brachystephana*, *M. odorata* y *M. conectens*), la identificación de cada flavonoide se completó con el aislamiento y caracterización individual, mientras que en las especies restantes, la identificación se realizó mediante el empleo de técnicas cromatográficas (con comparación con muestras auténticas), y espectroscópicas (U.V. y agregado de reactivos específicos).

Los flavonoides, son uno de los grupos de sustancias mas utili-

zados por quienes efectúan estudios de quimiotaxonomía, y se los ha empleado para ordenar las especies vegetales a nivel de género y aun de familia.

En las Morrenias, el número de flavonoides es pequeño, todos ellos de bastante difusión en la Naturaleza y por lo tanto su utilidad taxonómica no muy grande.

Tiene sin embargo valor dentro del género, porque en ninguna de las especies estudiadas, aparecen otros flavonoides distintos de los indicados. Es llamativa la ausencia de luteolina en las especies M. stuckertiana, M. schulziana y M. stormiana y de glucoluteolina en las dos últimas anteriores, siendo este el glicósido mayoritario en las especies restantes.

En el caso de la M. stuckertiana no parece tener mayor importancia la ausencia de luteolina, pues contiene el glicósido de esta flavona. Sin embargo, en los otros dos casos (M. schulziana y M. stormiana) esta diferenciación corrobora una característica de su clasificación botánica con respecto a las otras especies.

Por otra parte, la ausencia de luteolina y su derivado, resulta de interés, porque ambas especies se diferencian morfológicamente por pequeños detalles. En la clave de Meyer, creador de la especie M. schulziana en 1936, publicada en su monografía de 1944, se especifica que en esta especie, los lóbulos del apéndice estigmático filiforme, de 3 mm de altura son divergentes, mientras que para M. stormiana creada en 1903, estos lóbulos, tienen 1,5 mm de altura y son no divergentes. En todos los demás aspectos ambas especies coinciden.

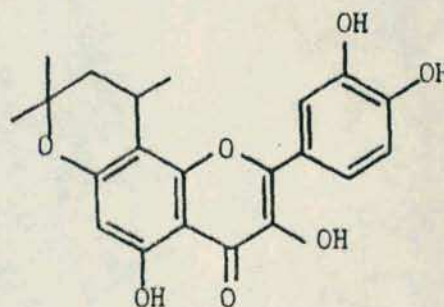
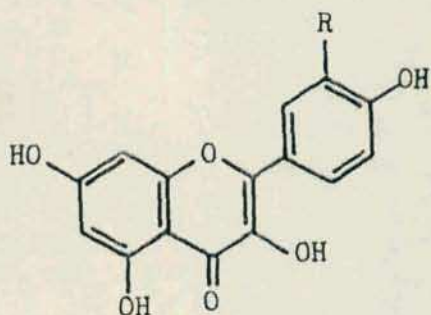
Aparentemente, esta diferencia es difícil de evaluar, porque las especies, que nos fueron remitidas con su clasificación, fueron a su vez clasificadas en forma diferente por otros dos botánicos de autoridad en la materia, a quienes se le solicitó su opinión, en Buenos Aires.

Dada la ausencia total, coincidente, de luteolina y su glucósido en M. schulziana y M. stormiana, sería conveniente realizar un nuevo estudio taxonómico, mediante la utilización de métodos que permitan conocer claramente las diferencias y similitudes entre ambas especies.

FLAVONOIDES DE ASCLEPIADACEAS

La información que se tiene sobre la presencia de flavonoides en Asclepiadáceas es reducida. Los trabajos efectuados por Bate-Smith (1961, 1962) sobre la presencia de fenoles en esta familia, indicaron que entre las plantas estudiadas se encontraron ácidos hidroxilados como cafeico, elágico, cumárico, sinápico, ferúlico y flavonoides comunes como canferol, quercetina y miricetina.

Desde estos trabajos, hasta la redacción de esta Tesis, sólo se ha encontrado un trabajo sobre fenoles de Asclepia syriaca, Gonnet et.al., (1973), quienes aislaron quercetina (138), un derivado de este flavonol (139), canferol (140) e isoramnetina (141).



R:

(138) -OH

(140) -H

(141) -OCH₃

(139)

DISTRIBUCION GENERAL DE LOS FLAVONOIDES

La capacidad para producir flavonoides, como una consecuencia regular del metabolismo secundario de las plantas, parece estar asociado filogenéticamente a la necesidad de lignificación. Los flavonoides, son así característicos de las plantas vasculares, y son raros o están ausentes en otros grupos de plantas.

Debido a este hecho, las primeras indicaciones en la literatura de flavonoides en microorganismos, fueron vistas con suspicacia porque no estaban satisfactoriamente sustentadas desde un punto de vista químico. Sin embargo algunos aislamientos esporádicos que se efectuaron posteriormente no modificaron la idea general representada en la Tabla 7.

TABLA 7

Evolución de los flavonoides en plantas

Grupo de plantas	Componentes flavonoides
Bacterias Hongos Algas rojas Algas verdes	Flavonoides casi completamente ausentes.
Musgos Hepáticas	Algunos tipos, principalmente, 3-desoxiantocianinas y glicoflavonas.
Helechos Licopodios	Flavonoides estructuralmente simples, flavonas, flavonoles, flavanonas y calconas.
Gimnospermas	Mayoría de flavonoides. Característicos las biflavonas.
Angiospermas	Rango completo de flavonoides (Biflavonas son raras).

Las Espermatófitas (plantas que contienen semilla), están todas mas o menos lignificadas (carácter leñoso), y como tales, contienen flavonoides; a menudo, se encuentran dentro de la misma planta, mezclas complejas de los mismos con distinto grado de oxidación.

Para correlacionar, dentro de un esquema evolutivo a los componentes aislados de las Morrenias, deben señalarse dos puntos generales de la distribución de flavonoides dentro de las Espermatófitas, y son las diferencias existentes entre las Gimnospermas y Angiospermas y dentro de éstas, entre Monocotiledóneas y Dicotiledóneas.

Las Gimnospermas tienen una distribución de flavonoides mas simple que las Angiospermas, por ejemplo flavonas y flavonoles con O-glicosilación, O-metilación u O-isoprenilación son relativamente raras en las primeras.

Las antocianinas comunes en frutos, flores y hojas de las Angiospermas, son de distribución restringida en las Gimnospermas, y sólo han sido detectadas en unas pocas especies (Lowry, 1968).

La mayor diferencia entre ambos grupos, reside en la presencia de biflavonoides, casi exclusiva en las Gimnospermas, aunque actualmente hay algunas excepciones (Hörhammer *et.al.*, 1965; Herbin *et.al.* 1969). Los biflavonoides, son dímeros formados por acoplamiento oxidativo de flavonas simples (usualmente apigenina), a través de la posición 8 de una, con la posición 8, 3' ó 4' de la segunda molécula.

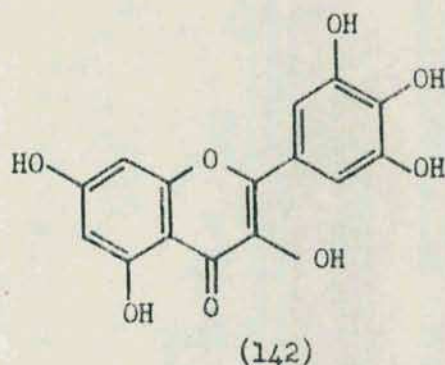
La existencia de estas excepciones (biflavonoides en Angiospermas) ocurre sólo en árboles (plantas leñosas), y puede verse como la retención de un carácter primitivo, que concuerda con la teoría que

las Angiospermas se desarrollaron a partir de las Gimnospermas (Harborne, 1973).

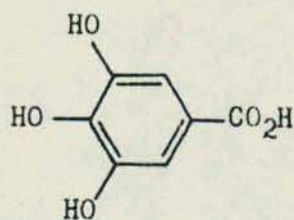
Así como este hecho está ampliamente reconocido, se considera también que las monocotiledóneas provienen de las dicotiledóneas por reducción.

Los dos grupos, no son marcadamente diferentes (a parte del carácter de cotiledón), aunque el estado mas evolucionado está indicado por la rareza general de especies leñosas en las monocotiledóneas.

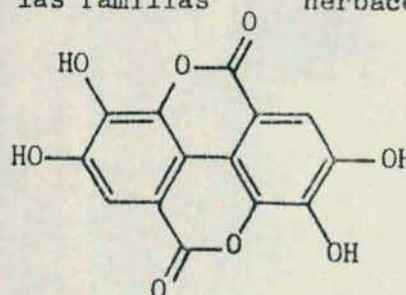
Los trabajos sobre los constituyentes polifenólicos de las hojas, efectuados por Bate-Smith (1958, 1962), establecieron una correlación entre los flavonoides y los cambios evolutivos de carácter leñoso a herbáceo en las Angiospermas. Bate-Smith (1962), en un estudio de cientos de especies, donde estaban representadas todas las familias importantes de plantas, mostró que las leñosas contienen característicamente en sus hojas glicósidos de leucoantocianidinas, y flavonoles, especialmente miricetina (142) (la cual posee el anillo B trihidroxilado), ácido gálico (143) y elágico (144), y sustancias



asociadas con la misma hidroxilación. Estas sustancias eran raras o estaban ausentes en la mayoría de las familias herbáceas.

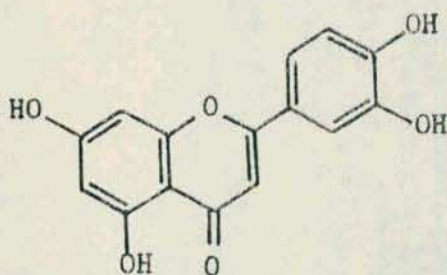


(143)

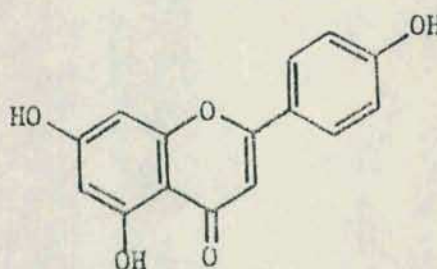


(144)

Los trabajos posteriores de Harborne (1966a, 1967a), y Crowden (1969), confirmaron que las plantas herbáceas contienen usualmente la flavona luteolina (145) y apigenina (146), y así, estas flavonas parecen reemplazar a los flavonoles, como los constituyentes principales de las hojas del grupo de las Angiospermas "mas avanzado" en un sentido evolutivo.



(145)



(146)

En resumen, el cambio de carácter leñoso a herbáceo en las plantas superiores, produce tres cambios en los flavonoides de hojas: desaparición de leucoantocianidinas, pérdida de la trihidroxil-

lación en el anillo B y reemplazo de flavonoles por flavonas.

El proceso de lignificación ha tenido un profundo efecto en la síntesis de flavonoides. Parte de éste, puede pensarse como una competición directa por un precursor común ácido cinámico C_6-C_3 ; y parte de ese efecto se produciría en forma mucho mas indirecta.

Este enfoque parcial sobre la distribución de los flavonoides en las plantas, muestra que su estudio puede revelar aspectos mas profundos que una ayuda en la clasificación de las especies, ya que están íntimamente relacionados a un significado filogenético.

CONCLUSION. De acuerdo a los resultados obtenidos, puede considerarse a las Morrenias como una fuente importante del triterpeno germanicol, con pocas variaciones en los tipos de sustancias aisladas.

Las diferencias de composición entre las distintas especies no son importantes, aunque en la distribución de flavonoides, la ausencia de la flavona luteolina en algunas de las especies, corrobora una característica de la clasificación botánica.

Los análisis biológicos efectuados con los extractos acuosos de M. brachystephana confirmaron su potencialidad con respecto a efectos lactogénicos, no común en especies vegetales, lo que da interés a un estudio químico posterior del origen del mismo.

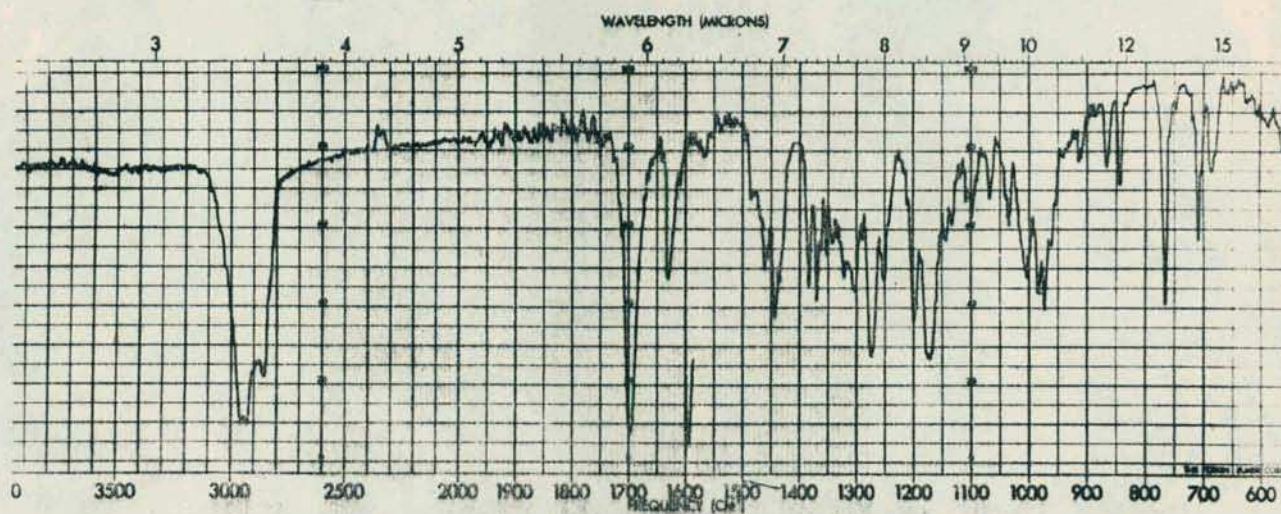
TRANS--CINAMATO DE GERMANICOL

FIGURA 21

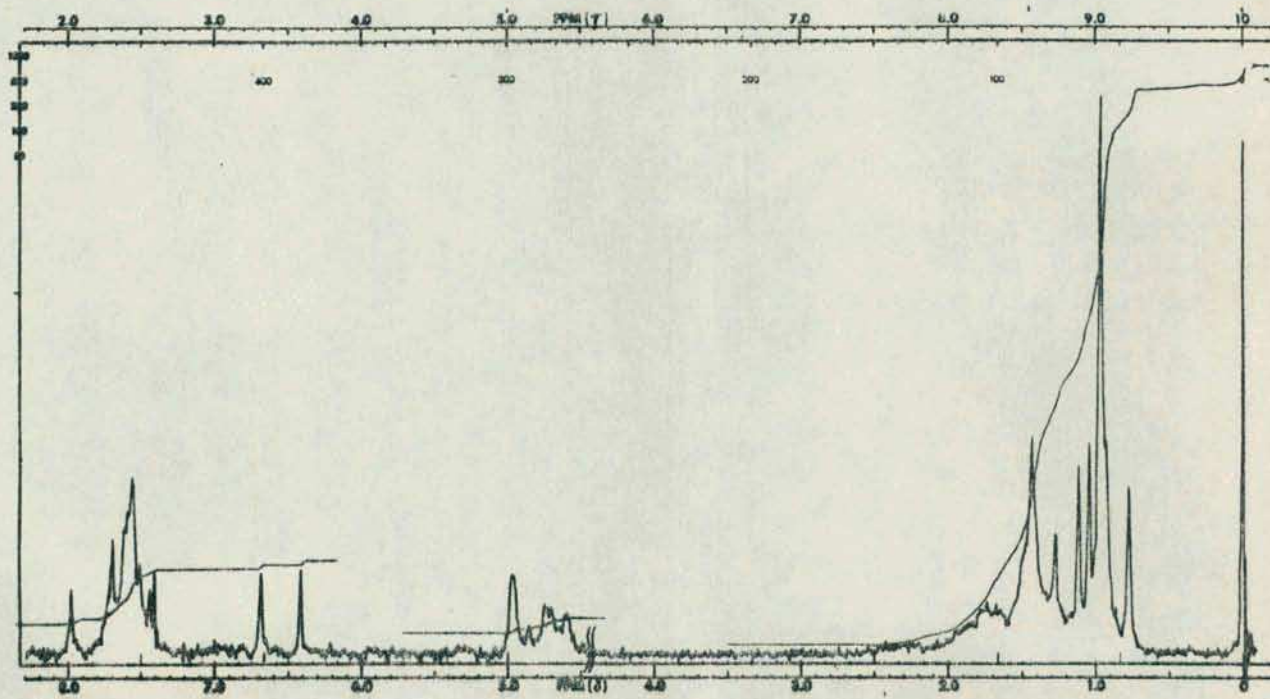


FIGURA 22

ACETATO DE GERMANICOL

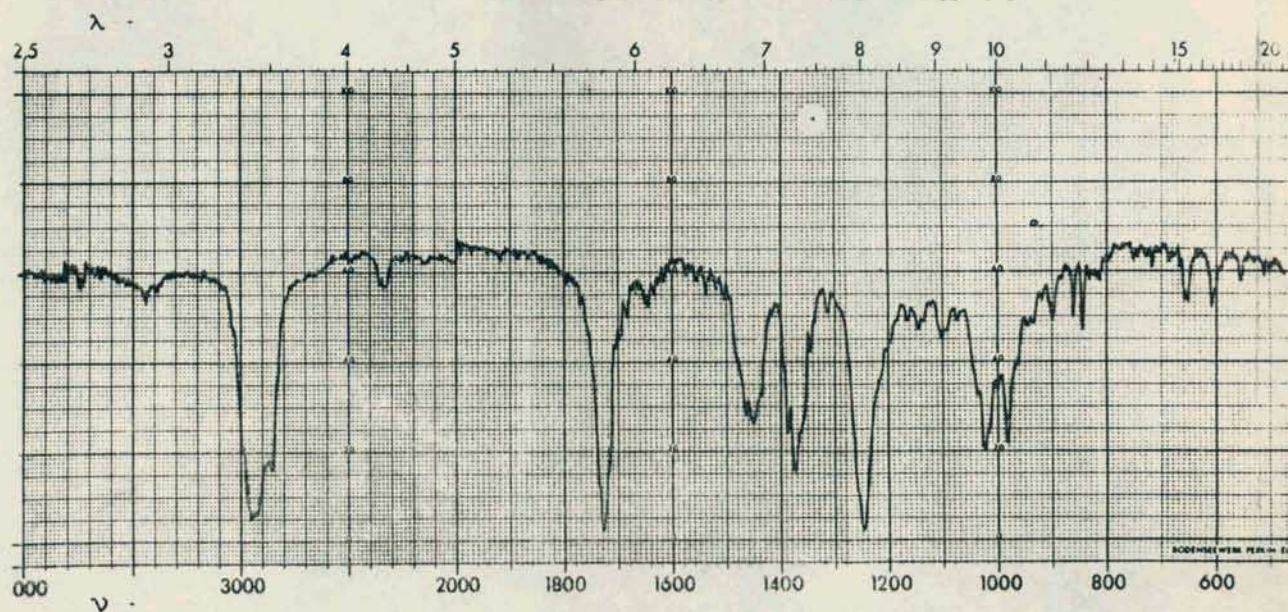


FIGURA 23

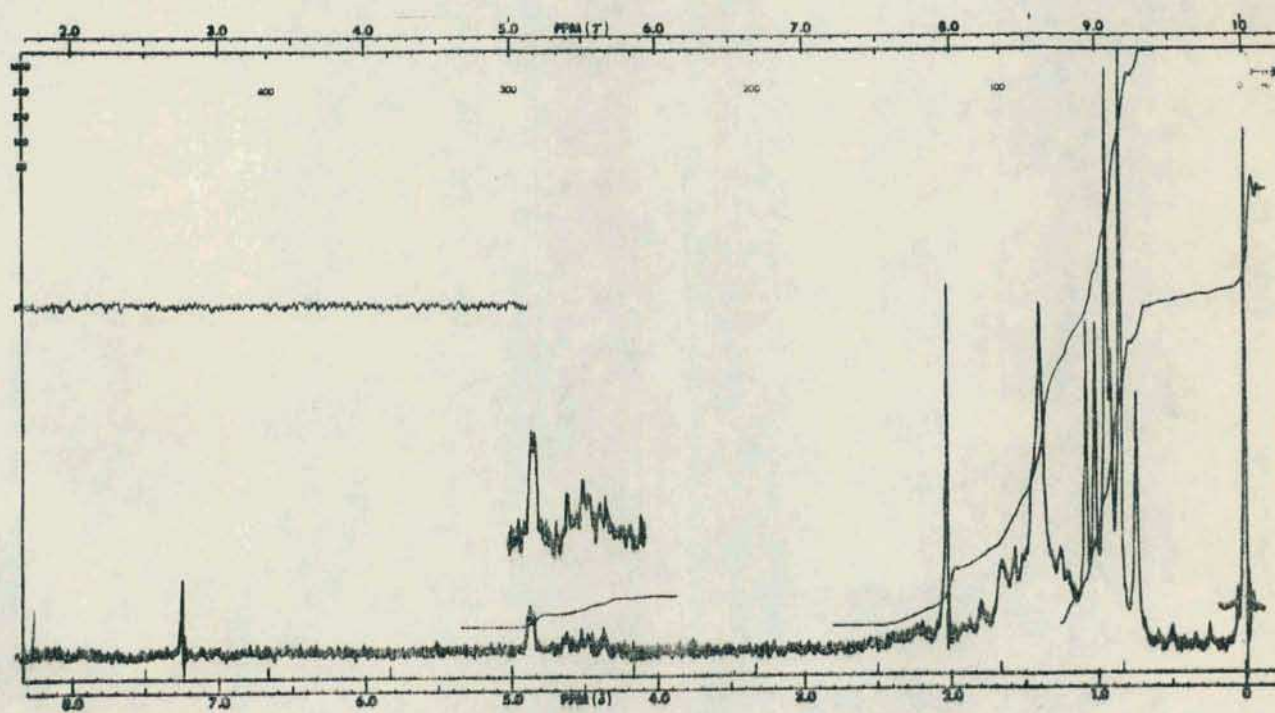


FIGURA 24

GERMANICOL

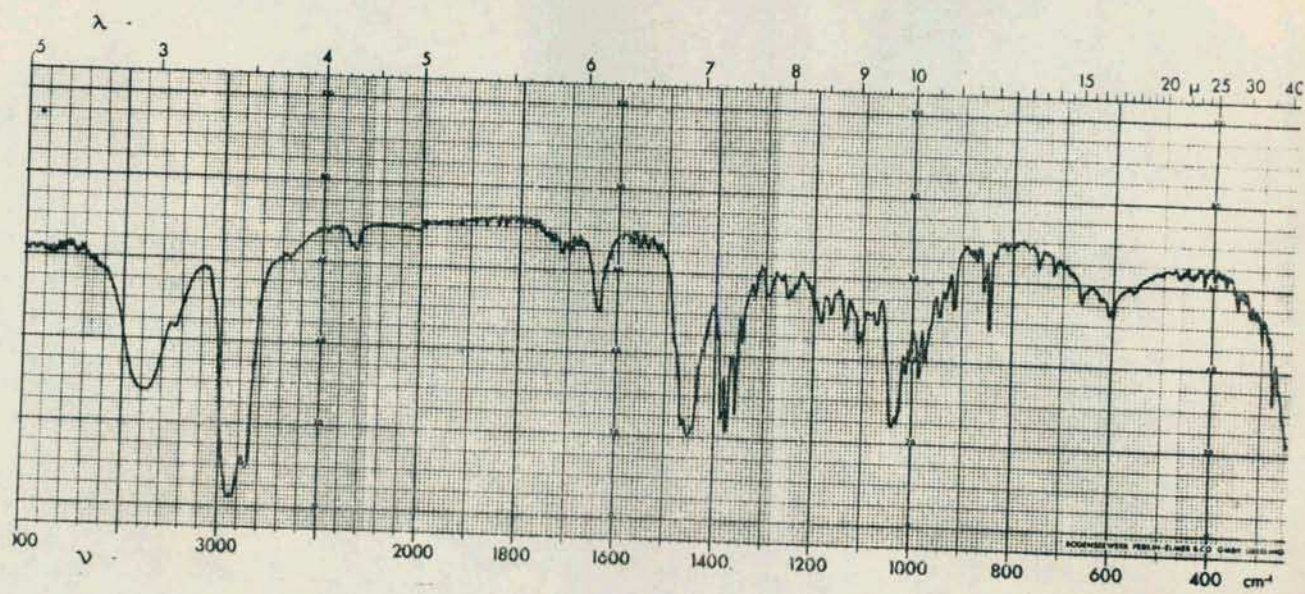


FIGURA 25

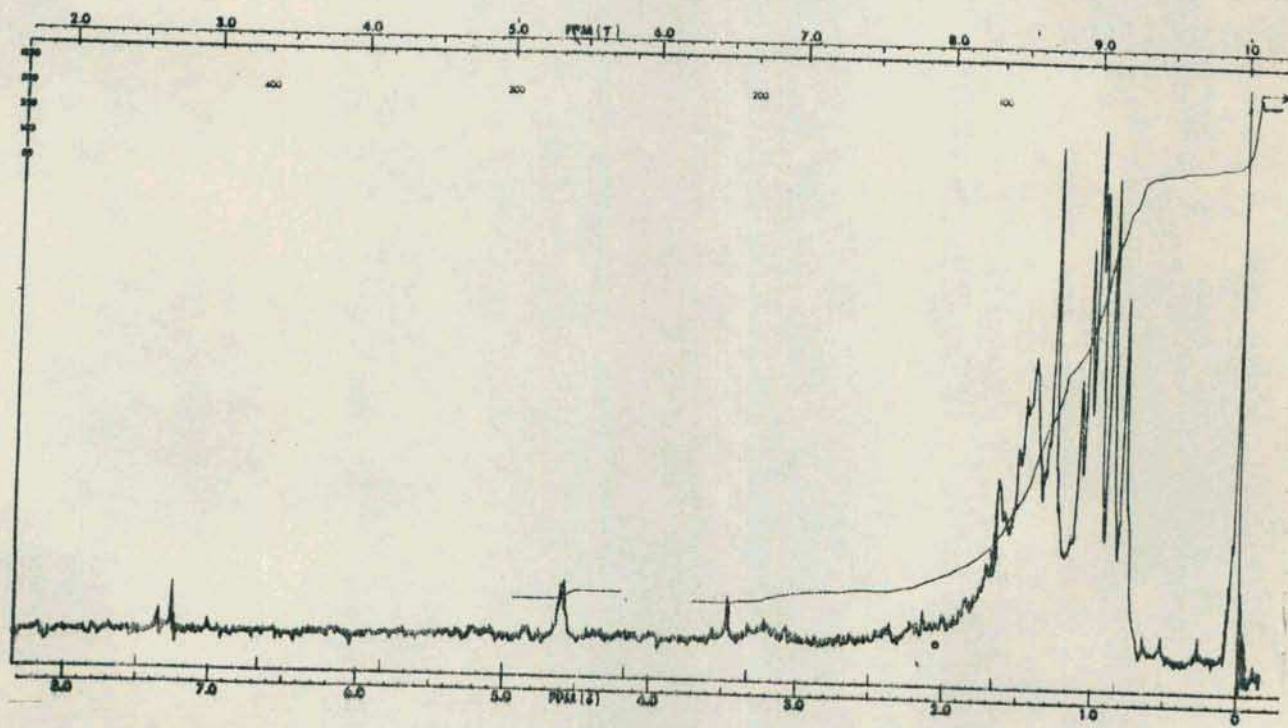


FIGURA 26

GERMANICONA

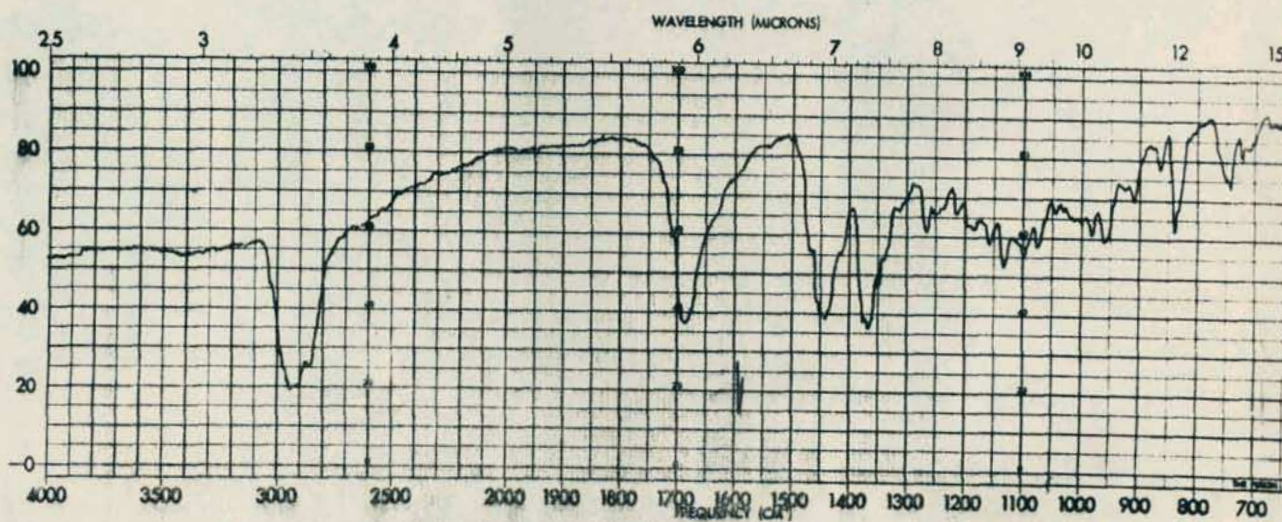


FIGURA 27

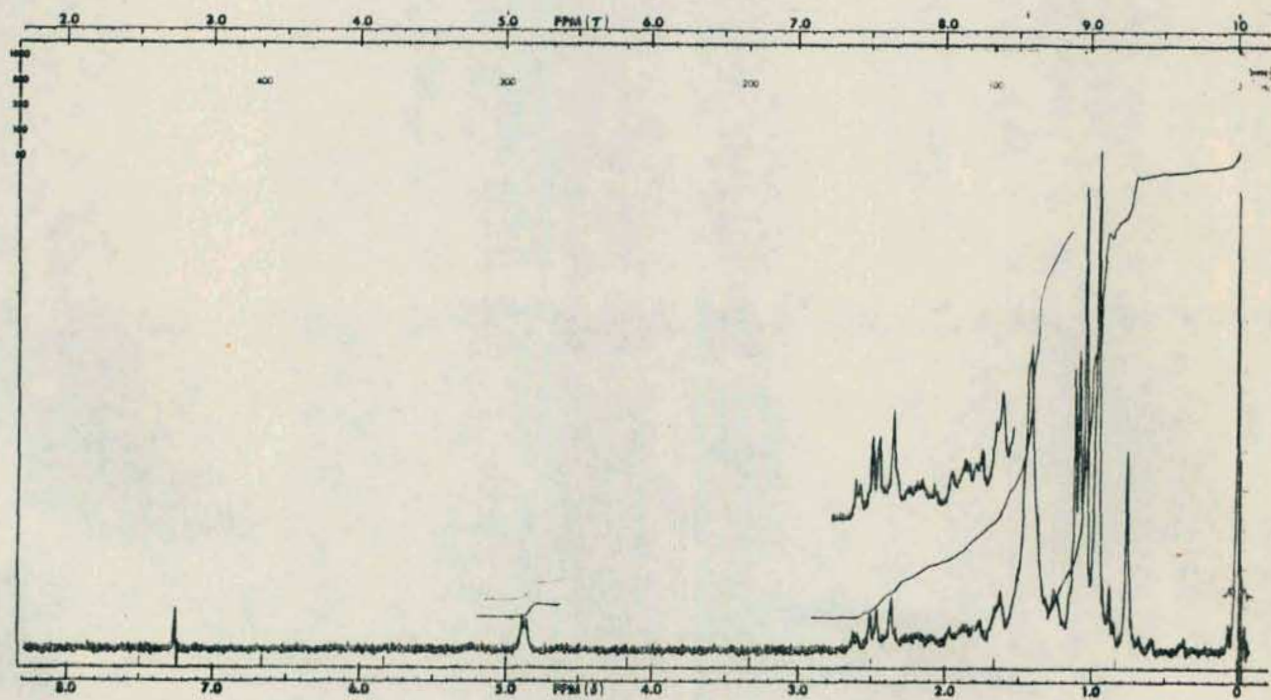


FIGURA 28

PARTE EXPERIMENTAL

METODOS EMPLEADOS

Los puntos de fusión (p.f.) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns, y no han sido corregidos.

Los poderes rotatorios fueron medidos en un polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 141, en tubos de 1 dm. Los solventes se indican en cada caso.

ESPECTROS

Los espectros de absorción ultravioleta (U.V.) de las sustancias puras, fueron determinados en un espectrofotómetro Beckman DK-2A, empleando metanol como solvente.

Los espectros de absorción infrarroja (I.R.), fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer 137-B Infracord, y los de alta resolución en un aparato Perkin Elmer 421. Las determinaciones se hicieron en suspensiones de nujol, o pastillas de bromuro de potasio según se indica.

Los espectros de resonancia magnética protónica (R.M.P.), se determinaron en un espectrofotómetro Varian A-60 utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los solventes empleados fueron los indicados en cada caso. Las abreviaturas usadas en la descripción de estos espectros son: s: singulete; d: doblete; t: triplete; c: cuarteto; m: multiplete.

Los espectros de masa (E.M.), fueron determinados en un espectrómetro Varian Mat CH-7.

ANALISIS

Los microanálisis elementales fueron realizados en el laboratorio Alfred Bernhart (Alemania).

CROMATOGRAFIA

Los cromatogramas gas líquido (c.g.l.), fueron realizados en un cromatógrafo Hewlett Packard 5750 B, con detector de ionización de llama, y un registrador Hewlett Packard 7127 A.

SOLVENTES

Todos los solventes empleados, fueron purificados y/o destilados y secados según Vogel (1966). El éter de petróleo, es la fracción que hierve entre 60 y 80°. Todas las mezclas están expresadas en relaciones en volumen (v/v). Para los solventes puros, se emplearán en algunos casos, sus fórmulas abreviadas usuales.

METODOS CROMATOGRAFICOS

Cromatografía en capa delgada (c.c.d.). En este trabajo, toda la c.c.d. se realizó según la técnica ascendente. En el caso de papel, se uso

exclusivamente cromatografía descendente.

Los adsorbentes utilizados fueron: Sílica Gel G (Merck, Alemania); poliamida Woelm y celulosa microcristalina Avicel (F.M.C. Corporation, Estados Unidos).

Para la cromatografía en capa fina, se procedió de la siguiente manera: a) sílica gel: se suspendieron 25 g en 50 ml de agua destilada con agitación manual vigorosa durante 30 seg.; b) poliamida: se suspendieron 5 g en 45 ml de la mezcla cloroformo-metanol (2:3); c) celulosa: 20 g en 80 ml de agua con agitación mecánica (licuadora), durante un minuto. En todos los casos se podían obtener 10 láminas de vidrio de 10 por 20 cm, en un espesor de 0,25 mm de adsorbente.

Solventes para el desarrollo cromatográfico. Los solventes empleados para el desarrollo cromatográfico, fueron los siguientes (relaciones v/v):

a) Para papel y celulosa

Sistema I (AcOH): ácido acético glacial-agua destilada (15:85).

Sistema II (BAA): n-butanol-ácido acético-agua destilada (4:1:5)

fase superior.

Sistema III (BEA): n-butanol-etanol-agua destilada (19:1:4).

Sistema IV : acetato de etilo-piridina-ác. acético- agua (5:5:1:3).

Sistema V (TBA): ter-butanol-ác. acético-agua dest. (3:1:1).

b) Para poliamida

Sistema VI: cloroformo-metanol-metil etil cetona (9:4:2).

c) Para sílica gel

Sistema VII: benceno.

Sistema VIII: cloroformo.

Sistema IX: benceno-acetato de etilo (95:5).

Sistema X: benceno-cloroformo (1:1).

En el texto se indicarán los sistemas, empleando su abreviatura o el número romano correspondiente.

Cromatografía en capa delgada de triterpenos y fitosteroles. La cromatografía de estos compuestos se efectuó, empleando placas de sílica gel que se eluyeron con los sistemas de solventes VII a X, y se revelaron con una mezcla de 20 ml de oleum 20% en 80 ml de ácido acético y posterior calentamiento a 110° (Bermejo et.al. 1968). Los fitosteroles dan manchas verdes o azules, y los triterpenos, violeta o púrpura.

Cromatografía de flavonoides. Para la cromatografía de estos compuestos, se emplearon placas de poliamida, celulosa microcristalina y papel Whatmann N° 1.

Las placas de poliamida, se desarrollaron con el sistema de solventes VI. En las placas de celulosa, el desarrollo se efectuó con los sistemas I a III, y para papel, se emplearon los sistemas I, II y V.

La técnica para detectar flavonoides, tanto en placas de poliamida y celulosa como en papel, fue la observación con luz ultravioleta a 254 y 366 nm (lámpara Desaga Uvis), y luego se sometieron a la acción de vapores de amoníaco y observación ulterior con la misma luz.

Para papel, se empleó además solución al 5% de cloruro de aluminio

en etanol (pulverizado), que da manchas amarillas (Gage y Wender, 1950) y ferricianuro de potasio-cloruro férrico (pulverizado), que da manchas azules sobre fondo amarillo (Barton et.al., 1952). En este último caso las manchas deben marcarse de inmediato después del revelado, ya que con el transcurso del tiempo, el fondo se vuelve azul, e impide la buena observación.

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se pueden visualizar una buena parte de los flavonoides naturales o sus agliconas como flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, calconas, auronas, antocianinas, catequinas, etc. (Harborne, 1958, 1959).

Cromatografía de hidratos de carbono. La cromatografía de estos compuestos, se realizó en placas de celulosa con el sistema IV o en papel con el sistema II.

Para detectar azúcares, se pulverizó la placa con una solución de 1,66 g de ácido o-ftálico y 0,93 g de anilina (bidestilada sobre cinc) en 100 ml de n-butanol saturado de agua y posterior calentamiento, que da manchas color marrón claro con aldohexosas (Partridge, 1949).

Cromatografía preparativa de los flavonoides detectados. Para la preparación cromatográfica de los flavonoides encontrados, se empleó papel Whatman 3 MM (46 x 57 cm), con elución descendente.

Cuando se empleó la técnica monodimensional, se trazó una línea a 10 cm del lado mayor del papel, y sobre ella se depositó en la forma mas homogénea posible, con una pipeta adecuada, la solución de flavo-

noides, conteniendo hasta 200 mg de producto. Se eluyó empleando el sistema I, hasta unos 2 cm del borde inferior del papel.

Para la técnica bidimensional, se depositaron en la misma forma hasta 50 mg de flavonoides en solución metanólica, sobre un punto marcado en uno de los ángulos del papel, a 10 cm de cada uno de los bordes. Se eluyó primero en el sentido mayor del papel, en todos los casos se empleó el sistema V (TBA), hasta que el solvente llegó a 2 cm del borde inferior del cromatograma (aproximadamente 24 hs. a 22°). Los valores de R_f medidos en este sentido se indican como R_{fA} .

Después de secar el cromatograma al aire, se eluyó en la dirección perpendicular a la anterior, utilizando el sistema I (AcOH), hasta unos 2 cm del borde inferior del cromatograma. Esta operación demandó unas 5 hs a 22°. Los valores de R_f medidos en este sentido se indican como R_{fB} .

Cromatografía en columna. Los adsorbentes utilizados fueron los siguientes: Sílica Gel para columna grado 923, malla 100-200 (Davison Chemical, Estados Unidos); polvo de celulosa Whatman Chromedia CF-11; polvo de nylon marca Polypenco, tipo 66-D (The Polymer Co., Reading, Estados Unidos).

Preparación de columnas de poliamida. La cantidad de poliamida necesaria suspendida en agua, se vertió dentro de la columna cromatográfica, en cuya salida se había colocado una pequeña cantidad de lana de vidrio. Se hizo pasar agua hasta que el nivel superior del adsorbente permane-

ciera estacionario, y además se asegura la eliminación de los residuos de bajo peso molecular que contenga el adsorbente.

Cromatografía en fase gaseosa. Todas las cromatografías gas-líquido se realizaron en columnas de acero rellenas con fases líquidas y soportes de Applied Science Laboratories, Inc. (Pennsylvania), según las siguientes condiciones:

TIPO DE COMPUESTO	HIDROCARBUROS	TRITERPENOS	ESTEROIDES	TMS ETERES DE AZUCARES
COLUMNAS	OV-101, 3%	id.	OV-1, 3%	OV-17, 3%
Fase líquida (1)				
Soporte (2)	Chromosorb W (AW-DMCS)	id.	id.	Chromosorb W (H.P.)
Long. y diám.	180; 0,32 cm	id.	id.	id.
FLUJO DE GASES cm ³ /min.				
Portador (N ₂)	40	60	60	55
Aire	220	200	220	220
Hidrógeno	35	35	35	35
TEMPERATURAS (°C)				
Horno, inicial	200	250	250	130
Horno, final	280	290	290	200
Cámara inyec.	280	310	300	180
Detector	300	330	335	260
OPERACION	200-280	250-290	250-290	130-200
Veloc. programa	10°C/min	10	10	6

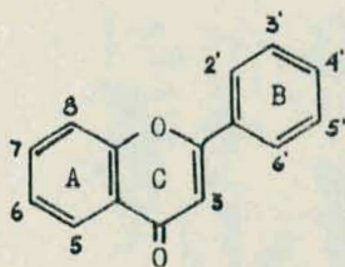
- (1) Las fases líquidas OV-1 y OV-101 son metil siliconas, mientras que OV-17 es una metil-fenil silicona (50%).
- (2) El Chromosorb usado para soporte es en todos los casos, del tipo lavado con ácidos y tratado con dimetilclorosilano.

APLICACION DE METODOS ESPECTROSCOPICOS PARA DETERMINAR LA ESTRUCTURA DE FLAVONOIDES.

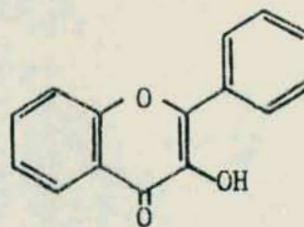
Nos referiremos en este caso a las estructuras de flavonas y flavonoles, que fueron los compuestos hallados en este trabajo, aunque los métodos detallados a continuación pueden aplicarse a otros flavonoides.

ESTUDIO DE LA ABSORCION U.V.

Las flavonas (30) y los flavonoles (33), generalmente exhiben dos máximos de absorción, uno en la zona de 320-280 nm (banda I), y otro en la zona de 270-240 nm (banda II) (Skarzynski, 1939). La posición e intensidad de cada uno de estos máximos, varía con la sustitución en los restos aromáticos (anillos A y B), y en el ciclo piránico (C).



(30)



(33)

Un estudio de los espectros U.V. de flavonas y flavonoles, con diferente sustitución a distinto pH, indicó que la banda II está asociada prácticamente siempre con la absorción del anillo A, y la banda I

con la absorción del anillo B (Jurd y Horowitz, 1957).

El agregado de reactivos específicos, como cloruro de aluminio, metilato de sodio, acetato de sodio, ácido bórico-acetato de sodio, producen desplazamientos de los máximos, de acuerdo con la posición de los grupos funcionales, lo cual con la información que actualmente se posee, ayuda a determinar la posición de los sustituyentes en el esqueleto flavonoide.

Para esta operación se emplea una solución de la aglicona o glicósido en metanol (aproximadamente 0,1 mg en 10 ml de solvente) (Porter y Markham, 1970), estudiándose sobre fracciones de 2,5 ml de la misma, las modificaciones que producen sobre las bandas I y II, la adición de los reactivos mencionados.

Cloruro de aluminio - ácido clorhídrico. (Grupos hidroxilo en posiciones 3 y 5). A la solución metanólica preparada como se ha indicado, se añadieron 6 gotas de una solución 5% de Cl_3Al en metanol, y se observó si se producían desplazamientos, que son siempre batocrómicos, en las bandas I y II.

Se agregó a la misma solución, conteniendo Cl_3Al , 3 gotas de solución acuosa de ácido clorhídrico 30%, y se observó si había variaciones en los desplazamientos producidos con el reactivo anterior.

El Cl_3Al sirve para la detección de grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 5 (Hörhammer y Hänsel, 1952; Jurd y Geissman, 1956). Las 5-hidroxi flavonas, forman un complejo metálico que provoca desplazamientos batocrómicos en la banda I de 35 a 55 nm, mientras que en los fla-

vonoles (3-hidroxi flavonas), el desplazamiento de dicha banda es de aproximadamente 60 nm. Estos complejos son estables aun en medio ácido.

Los complejos con aluminio, formados por grupos hidroxilos vecinos dan también desplazamientos batocrómicos, pero se descomponen en medio ácido, produciendo un corrimiento hipsocrómico de 30-40 nm (Markham y Mabry, 1968).

Metóxido de sodio. (Grupos hidroxilo en posiciones 3 y 4'). Sobre otra porción (2,5 ml), de la solución metanólica del flavonoide, se añadieron 3 gotas de una solución de 2,5 g de sodio en 100 ml de metanol.

Un desplazamiento batocrómico de la banda I, entre 40 y 65 nm, sin disminución de su intensidad, es utilizado como diagnóstico para la presencia de un hidroxilo en la posición 4' (Mansfield et.al., 1953; Nördstrom y Swain, 1953).

La adición de álcali fuerte a flavonas y flavonoles, produce desplazamientos variables de todas las bandas de absorción. La presencia simultánea de hidroxilos libres en las posiciones 3 (ciclo C) y 4' (anillo B), determina que los flavonoides sean inestables en este medio, y los máximos desaparecen en pocos minutos (Jurd y Horowitz, 1957).

Acetato de sodio. (Determinación de hidroxilo en posición 7). Cuando se satura con una base débil, como es el acetato de sodio, la solución metanólica del flavonoide, se ionizan solamente los grupos hidroxilos mas acídicos, que ocupan las posiciones 3, 7 y 4' (Jurd y Horowitz, 1957).

Si existe un hidroxilo en la posición 7, se producirá un despla-

miento batocrómico de la banda II de 5 a 20 nm. Estos desplazamientos no suelen ser tan fácilmente observables como los de la banda I en medio alcalino fuerte.

Con este reactivo (AcONa), también se observa disminución de la intensidad de absorción de las bandas, en presencia de un grupo de sustituyentes sensibles a álcalis. Son los flavonoides que contienen hidroxilos en posiciones 5, 6 y 7; 5, 7 y 8 y 3, 3' y 4'.

Acetato de sodio-ácido bórico. (Grupos hidroxilos vecinos). Puede estudiarse también la presencia de grupos hidroxilos vecinos, observando las modificaciones producidas por agregado de ácido bórico a la solución saturada con acetato de sodio (Jurd, 1956). La reacción ha sido modificada por Mabry *et.al.*, (1970), para poder estudiar sustancias inestables a los álcalis.

Se investiga primero la estabilidad de la muestra en metóxido de sodio, tal como se ha indicado. Si la muestra no se descompone, a la solución saturada con AcONa, se la satura con ácido bórico y se determina su espectro.

Un corrimiento batocrómico de 12-30 nm de la banda I, implica la existencia probable de un grupo de hidroxilos vecinos en el anillo B. Ocurre un hecho similar si existen hidroxilos vecinos en el anillo A.

Si la muestra es inestable en MeONa, se añaden a la misma 5 gotas de una solución saturada de ácido bórico en metanol, que luego se satura con AcONa, y se determina el espectro de inmediato.

Si existen hidroxilos vecinos, se observan los desplazamientos in-

dicados anteriormente.

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA (R.M.P.)

La determinación de los espectros R.M.P. de los glicósidos flavonoides y agliconas, fue realizada transformándolos en trimetil silil éteres (TMS éteres), siguiendo las técnicas indicadas por Waiss et.al. (1964) y Mabry et.al., (1965).

Los TMS éteres, se obtuvieron añadiendo a una solución de la muestra (25 mg) en 1 ml de piridina seca, 0,5 ml de hexametil disilazano (Fluka, Suiza) y 0,5 ml de trimetilclorosilano (Schuchardt, Alemania), y se mantuvo tapado 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante fue evaporada a sequedad a presión reducida (10 mm de Hg), y secada a temperatura ambiente durante 45 minutos (1 mm de Hg).

El residuo libre de solvente, se extrajo con tetracloruro de carbono (1 ml), y se filtraron las sales, evaporándose a sequedad el filtrado. El residuo amorfo resultante, se uso inmediatamente para la determinación del espectro R.M.P. empleando CCl_4 como solvente.

El producto empleado para la determinación de su espectro R.M.P., se recuperó en algunos casos, evaporando el solvente y disolviéndolo en metanol acuoso, con el agregado de una gota de ácido acético, y dejándolo una noche a temperatura ambiente. El sólido obtenido, puede ser empleado para ensayos cromatográficos.

METODO EMPLEADO PARA LA IDENTIFICACION DE GLICOSIDOS FLAVONOIDES

Cuando se aisla un glicósido y se quiere determinar el espectro R.M.P. de la aglicona, utilizamos con resultado el siguiente método: 30 mg del glicósido, se tratan con 3 ml de ácido clorhídrico 2N y se calientan a 110° durante 1 hora en tubo cerrado. La aglicona, se extrae de la mezcla resultante con acetato de etilo (5 x 2 ml), el extracto se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora; el residuo se emplea para la determinación espectroscópica de la aglicona, en la forma antes indicada.

Cuando la aglicona no puede extraerse, luego de la hidrólisis, mediante un solvente orgánico no miscible, se pasa la solución acuosa acídica, por una columna de poliamida (4 x 1 cm) preparada en agua, que fija toda la aglicona liberada. Se lava la columna con agua, que eluye todos los hidratos de carbono, hasta que la muestra eluída tenga pH 7. Esta se evapora a sequedad y se procede a la determinación de los azúcares como se indica mas adelante.

La columna se eluye luego con etanol, lo cual permite recuperar la aglicona que en algunos casos incluso puede cristalizar de los líquidos de elución. Este extracto, puede emplearse para la determinación espectroscópica y cromatográfica.

Para identificar los azúcares provenientes de la hidrólisis anterior, lo mas conveniente es el empleo de la cromatografía gas-líquido de los TMS éteres correspondientes, aprovechando la solución acuosa acídica extraída con acetato de etilo. Este extracto se evapora a seco

y se disuelve en piridina seca (0,5 ml).

Los TMS éteres de los azúcares, se preparan por agregado sucesivo de 0,2 ml de hexametil disil azano y 0,1 ml de trimetil clorosilano, en un frasco ampolla de 4 ml de capacidad. Se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugan las sales insolubles formadas durante la sililación, y la solución sobrenadante, si está límpida, es utilizable para c.g.l.

TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

A. Morrenia brachystephana Griseb.

EXTRACCION. La parte aérea del vegetal (ramas y hojas) (6 kg), secada en estufa a 45°, fue molida empleando una malla de 2 mm en un molino Wiley, modelo ED-5.

El polvo obtenido, fue extraído en forma continua, en un extractor SGA Scientific Inc. modelo JE 5550, utilizando 3 kg cada vez, con éter de petróleo durante 40 hs.

El extracto dio por evaporación, un aceite espeso de color verde oscuro (282 g, 4,7%) (Residuo I).

A continuación, el vegetal extraído, fue secado y sometido a una extracción con cloroformo durante 30 hs, obteniéndose al evaporar el solvente, un residuo siruposo oscuro (53 g, 0,8%), que se denominó Residuo II.

Por último, el sólido restante, una vez secado, fue extraído con metanol durante 60 hs. Se obtuvo una solución oscura con un contenido de 1490 g de sólidos (23,3%), que se denominó Residuo III (extracto metanólico).

Fraccionamiento del Residuo I. Una pequeña fracción del Residuo I, disuelta en éter de petróleo, cromatografiada en capa fina (sílica gel, sist. X, rev. óleum/AcOH), dio un grupo de manchas aglomeradas y poco

definidas con Rf 0,5-0,9, y otro grupo con Rf 0,0-0,3, formado por manchas de poca intensidad. Además en toda la placa se observó un fondo de color gris. Como evidentemente las placas no podrían emplearse para fines preparativos, se resolvió efectuar un fraccionamiento con columna de sílica gel.

Cromatografía en columna del Residuo I. Cuarenta gramos del Residuo I, se mezclaron con 90 g de sílica gel, y la pastilla formada, fue cromatografiada en una columna del mismo material (740 g, 59 x 7 cm), empapada con éter de petróleo. La elución se efectuó, empleando distintas mezclas de solventes, recogiendo fracciones de 1 litro. Las fracciones fueron evaporadas individualmente y los residuos analizados por c.c.d. Los resultados se indican en la Tabla 8.

Fracciones 1-2. Identificación de hidrocarburos alifáticos. El sólido blanco cristalino, Liebermann-Burchard negativo, eluido en las primeras fracciones, fue recristalizado, disolviendo en benceno hirviendo y añadiendo metanol caliente hasta turbiedad. Dejado en cámara fría durante la noche, se obtuvieron láminas brillantes de p.f. 65-67°.

Análisis: encontrado: C, 85,1; H, 14,4.

U.V.: no absorbe en la zona 450-220 nm.

I.R. (nujol): 1400 (CH_3 -; $-\text{CH}_2$ -); 800 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$ -).

R.M.P. (CDCl_3): 0,89 (s, $-\text{CH}_3$); 1,26 (s, $-\text{CH}_2$ -) ppm. Relación aproximada 1:10.

TABLA 8

Cromatografía en columna de sílica gel del Residuo I

Fr.Nº	Solvente elución	Relación	Peso gr	Punto de fusión	Reacción L.B.(a)	Producto obtenido
1-2	éter de petróleo		2,322	60-65º	(-)	sólido blanco cristalino
3-4	e.p./benceno	95:5	0,020			aceite (b)
5-7	"	9:1	4,264	190-225º	(+)	sólido amarillo-naranja
8-18	"	8:2	14,900	172-195º	(+)	sólido amarillento cristalino
19-20	"	7:3	0,640		(+)	aceite amarillo (b)
21-22	"	1:1	0,974		(+)	aceite (b)
23-25	benceno		0,320		(+)	aceite (b)
26-31	benceno/ cloroformo	1:1	3,264	145-160º	(+)	sólido blanco cristalino
32-33	cloroformo		0,880		(±)	aceite (b)
34-37	metanol		<u>7,336</u>		(-)	aceite verde oscuro (b)
			34,900			

(a) Reacción de Liebermann-Burchard, realizada en placa de toque:

(+) : positivo; (±) : débil; (-) : negativo.

(b) estas fracciones fueron descartadas.

Los datos de análisis y espectroscópicos, demostraron que se trataba de hidrocarburos, los cuales sometidos a una cromatografía gas-líquido, resultaron ser una serie homóloga de hidrocarburos lineales, siendo asignada la identidad de las señales, mediante el empleo de varios standards. El componente principal, fue el hentriacontano ($C_{31}H_{64}$), que representa el 52% del total de hidrocarburos, siguiéndole en importancia el tritriacontano ($C_{33}H_{68}$) con 23%.

Los tiempos de retención y porcentajes relativos, pueden verse en la Tabla 9.

TABLA 9

nº de át. carbono	23	25	27	28	29	30	31	32	33
%	1,7	1,9	2,8	0,9	9,4	2,9	51,9	4,4	23,2
tiempo de retención (seg.)	339	423	508	560	611	673	757	847	960 (x)

(x) Condiciones indicadas en la página 114.

Fracciones 5 - 18. Aislamiento de trans-cinamato de germanicol y acetato de germanicol.

a) Fracciones 5-7. Estas fracciones, estudiadas por c.c.d., dieron una única mancha principal de Rf 0,66 (sílica gel, cloroformo), con impurezas de mayor Rf. Estas fracciones reunidas y recristalizadas repetidas veces de benceno-alcohol, y luego de acetato de etilo, dieron placas hexagonales incoloras de p.f. 248-250° (210 mg), $[\alpha]_D^{21} = +8,2$ (c: 3,22

cloroformo), que fueron identificadas posteriormente como trans-cinamato de germanicol.

b) Fracciones 8-18. Fraccionamiento de cinamato y acetato de germanicol.

El análisis de estas fracciones por c.c.d., dio dos productos de Rf 0,65 y 0,56 (sílica gel, cloroformo). Debido a la similitud de su contenido, se reunieron, y una parte (5,2 g) fue cromatografiada en una columna de sílica gel (600 g, 57 x 6 cm) empapada en éter de petróleo, recogiendo fracciones de 200 ml según el detalle de la Tabla 10.

Las distintas fracciones obtenidas en esta cromatografía, que contenían productos idénticos, según el análisis por c.c.d., se trabajaron en la forma indicada a continuación.

Las fracciones cristalinas 11 a 38 (Tabla 10) con Rf 0,65, fueron reunidas y recristalizadas repetidas veces de acetato de etilo. Se obtuvo un producto cristalino blanco, de punto de fusión 249-250°, idéntico al obtenido de las fracciones 5-7 recristalizadas (Tabla 8). Esta sustancia fue soluble en cloroformo y benceno, poco soluble en acetona y acetato de etilo; $[\alpha]_D^{18} = +8,65$ (c: 4,125, cloroformo), que resultó ser trans-cinamato de germanicol.

Análisis, encontrado C, 83,45; H, 10,20.

calculado para $C_{30}H_{56}O_2$: C, 84,12; H, 10,13.

U.V. (EtOH): $\lambda_{\text{máx.}}$ 278 nm (log. ϵ 4,2).

I.R. (BrK): 1730 (carbonilo de éster α - β no saturado); 988 (doble ligadura); 775 cm^{-1} (aromático). Figura 21.

TABLA 10

Cromatografía de las fracciones 8-18 de la Tabla 8

Fr. N°	Solvente elución	Relación	Peso mg	Punto de fusión	Producto obtenido (1)
1-3	éter de petróleo		—		
4-10	e.p./benceno	9:1	166	180-220°	aceite Rf 0,65 e impureza de Rf 0,73
11-24	"	8:2	630	217-230	cristales Rf 0,65
25-38	"	7:3	1574	222-235	cristales Rf 0,65
39-59	"	6:4	1090	190-215	Crist. Rf 0,65 y Rf 0,56
60-69	"	1:1	846	185-218	crist. Rf 0,65 débil y Rf 0,56
70-74	benceno		480	212-240	cristales Rf 0,56
75-79	benceno/ cloroformo	1:1	<u>54</u>		aceite
			4840		

(1) Los productos obtenidos fueron estudiados por cromatografía en capa delgada de sílica, eluyendo con cloroformo y revelando las manchas con el revelador óleum-ácido acético.

R.M.P. (CDCl_3): 0,75; 0,85; 0,92; 0,97; 1,03; 1,12 (24 H, m, 8 x CH_3 -); 4,73 (1 H, m, $\text{H}-\text{C}_3$); 4,98 (1 H, s, $\text{H}-\text{C}_{19}$); 6,60 (1 H, d, J_{trans} 16 Hz, $-\text{CO}_2\text{CH}=\text{CH}-$); 7,55 (5 H, m, ArH); 7,85 (1 H, d, J_{trans} 16 Hz, $\text{ArCH}=\text{CH}-$) ppm. Figura 22.

E.M.: M^+ , 556 (8,65%); 408 (7,3); 393 (8,5); 218 (23,4); 204 (100); 189 (81); 147 (14,8); 131 (91).

Hidrólisis alcalina del producto de p.f. 249-250°.

a) Aislamiento de germanicol. El producto de p.f. 249-250° (116 mg), disuelto en benceno (10 ml) fue hervido a reflujo con una solución de hidróxido de potasio en etanol 10% (10 ml) durante dos horas.

El producto de la reacción fue diluido con 20 ml de agua y extraído con benceno (3 x 20 ml). El extracto bencénico se lavó con agua (3 x 5 ml), se secó con sulfato de sodio y se evaporó el solvente a sequedad. El residuo blanco cristalino (90 mg) fue recristalizado de acetona para dar agujas blancas de p.f. 176-177° (R_f 0,30, sílica gel, cloroformo); $[\alpha]_D^{18} = +6,1$ (c, 3,25; cloroformo), que fue identificado como germanicol. Simpson (1944) dio p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{17} = +5,8$. Su espectro infrarrojo fue superponible con el de una muestra auténtica.

Análisis, encontrado C, 83,95; H, 11,86.

calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$: C, 84,30; H, 11,80.

I.R. (BrK): 3340 (hidroxilo); 870 cm^{-1} (doble ligadura). Figura 25.

R.M.P. (CDCl_3): 0,77; 0,87; 0,93; 0,97; 1,01; 1,07 (24 H, m, $8 \times \text{CH}_3$ -);
3,10 (1 H, m, H-C₃); 4,60 (1 H, s, H-C₁₉) ppm. Figura 26.

E.M.: M^+ , 426(35%); 411 (22), M^+ - metilo; 408 (5), M^+ - agua; 393 (3)
218 (69); 205 (51); 204 (100); 189 (94); 177 (89).

El espectro de R.M.P. coincidió con el registrado en la literatura, Ireland et.al., 1970, y González et.al., (1971). El espectro de masa coincidió con el descrito por Chow y Quon (1970).

b) Aislamiento de ácido trans-cinámico. La solución acuosa alcalina anterior, se acidificó con ácido clorhídrico (pH 2) y se extrajo con cloroformo (3 x 15 ml); se secó sobre sulfato de sodio, y se evaporó a sequedad. Por cristalización de agua, se obtuvieron agujas blancas de punto de fusión 134-135°. El punto de fusión mezcla, con una muestra auténtica (p.f. 134-135°) obtenida por cristalización de un producto comercial (Eastman Kodak), no sufrió depresión.

Equivalente de neutralización: encontrado 148,0
calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, 148,16

U.V. (EtOH): $\lambda_{\text{máx.}}$ 275 nm (log. ϵ 4,30).

I.R. (BrK): 2920 (banda ancha, carboxilo); 1680 (carbonilo de ácido);
976 (HC=CH trans); 773 (aromático monosustituído); 703
(aromático monosustituído) cm^{-1} .

R.M.P. (CDCl_3): 6,46 (1 H, d, J_{trans} : 16 Hz, HC=CH-CO₂-); 7,43 (5 H, m, ArH); 7,81 (1 H, d, J_{trans} : 16 Hz, ArCH=CH-); 10,3
(1 H, s, -CO₂H) ppm.

Aislamiento de acetato de germanicol. Las fracciones 70-74 (Tabla 10) que daban una sola mancha de Rf 0,56 fueron recrystalizadas varias veces de acetona, obteniéndose láminas triangulares cristalinas de p.f. 272-273°, $[\alpha]_D^{18} = +17,8$ (c. 2,56 cloroformo). El punto de fusión mezcla con una muestra auténtica de acetato de germanicol (p.f. 273-274°) no mostró depresión. Simpson (1944), p.f. 274-276°, $[\alpha]_D^{20} = +18,1$. Su I.R. fue superponible con el de una muestra auténtica.

Análisis, encontrado

C, 81,05; H, 10,90.

calculado para $C_{32}H_{52}O_2$: C, 81,99; H, 11,11.

I.R. (BrK): 1730 (carbonilo de acetato) cm^{-1} . Figura 23.

R.M.P. ($CDCl_3$): 0,75; 0,85; 0,91; 0,95; 1,03; 1,10 (24 H, m, 8 x CH_3 -); 2,05 (3 H, s, CH_3 -CO₂-); 4,50 (1 H, m, $H-C_3$); 4,87 (1 H, s, $H-C_{19}$) ppm. Figura 24.

E.M.: M^+ , 468 (95); 453 (26); 408 (9); 393 (10); 218 (93); 204 (100); 189 (59); 177 (56).

Hidrólisis alcalina de acetato de germanicol. En 10 ml de benceno, se disolvieron 83 mg de acetato de germanicol y fue hervido a reflujo con solución de hidróxido de potasio en etanol 10% (10 ml), durante una hora. El producto de la reacción se diluyó con 20 ml de agua y se extrajo con benceno (3 x 20 ml). El extracto bencénico lavado y secado se evaporó a seco. El residuo fue recrystalizado de acetona para dar agujas blancas de germanicol (52 mg) de p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{18} = +5,4$ (c. 1,82 cloroformo). Sus propiedades físicas (p.f. mezcla) y espectros-

cópicas (I.R. superponible, R.M.P.), coincidieron con los de una muestra auténtica.

Aislamiento de germanicol libre. Las fracciones 26-31 de la columna de purificación del extracto en éter de petróleo (Tabla 8), dio una mancha de Rf 0,30 (sílica gel, cloroformo), que recristalizada de acetato de etilo varias veces, dio agujas blancas de germanicol de p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{18} = +6,3$ (c. 3,12 cloroformo).

Las propiedades físicas (p.f. mezcla) y espectroscópicas (I.R. superponible, R.M.P.) coincidieron con las de una preparación anterior.

Preparación de acetato de germanicol. Se adaptó el método de Simpson (1944). A 120 mg de germanicol de p.f. 174-175° disuelto en 4 ml de piridina, se le agregaron 4 ml de anhídrido acético y se dejó a temperatura ambiente. Luego de 20 hs, la mezcla fue volcada sobre 10 ml de agua helada y el precipitado formado (125 mg, 95%), se filtró y se secó. Recristalizado de acetona, dioláminas de acetato de germanicol de p.f. 270-272°, $[\alpha]_D^{20} = +17,4$ (c. 2,73 cloroformo). Literatura, Simpson (1944) p.f. 274-276°.

Benzoato: se preparó según la técnica habitual (Simpson, 1944), con cloruro de benzofilo y piridina a 100° (3 hs). Recristalizado de benceno-alcohol (3:1) dio láminas brillantes de p.f. 263-265°; $[\alpha]_D^{20} = +37,2$ (c. 2,78 cloroformo). Literatura, Simpson (1944), p.f. 269-270°; $[\alpha]_D^{19} = +39,0$

I.R. (BrK): 1720 (carbonilo de benzoato); 780 cm^{-1} (aromático monosustituido).

R.M.P. (CDCl_3): 0,74; 0,90; 0,92; 0,96; 1,00; 1,07 (24 H, m, $8 \times \text{CH}_3$); 4,73 (1 H, m, $\text{H}-\text{C}_3$); 4,87 (1 H, s, $\text{H}-\text{C}_{19}$); 7,50 (3 H, m, ArH); 8,07 (2 H, m, ArH) ppm.

Preparación de trans-cinamato de germanicol. Se preparó según el método empleado por Cohen (1908) para sintetizar el trans-cinamato de β -amirina, haciendo reaccionar cloruro de trans-cinamoílo con germanicol, como se indica mas abajo.

El cloruro de trans-cinamoílo necesario, fue preparado según Womack y McWhirter (1940). En un balón de 25 ml, se mezclaron 4,5 g de ácido t-cinámico comercial (p.f. 137-138°, etanol), con 3,6 g de cloruro de tionilo (p.eb. 75-75,5°, ρ : 1,64 g/ml). Se adaptó un refrigerante para reflujo, y se calentó en baño de glicerina a 90° durante una hora. El cloruro de ácido formado, se destiló bajo presión reducida (89°, 0,05 mm Hg), y se usó de inmediato.

Preparación del éster cinámico. A 87 mg de germanicol de p.f. 174-176° disuelto en 5 ml de benceno, se agregaron 0,2 ml de piridina y 50 mg de cloruro de t-cinamoílo, y se calentó a reflujo durante una hora.

Luego de ese lapso, se destruyó el exceso de cloruro de ácido con 10 ml de solución de bicarbonato de sodio 10%. La solución alcalina se extrajo con éter etílico (3 x 5 ml), y el extracto etéreo lavado y secado sobre sulfato de sodio, se evaporó para dar un sólido, que

purificado por cinco cristalizaciones de acetato de etilo, dió láminas prismáticas de p.f. 247-259°, $[\alpha]_D^{21} = +8,92$ (c. 2,72 cloroformo), que se identificó como trans-cinamato de germanicol.

Sus propiedades físicas (p.f. mezcla) y espectroscópicas (I.R. superponible, R.M.P., E.M.) coincidieron con las del producto aislado directamente de Morrenia brachystephana.

Oxidación de germanicol. La oxidación se llevó a cabo, empleando el método de Jones (Bowers et.al., 1953) con solución de ácido crómico en acetona. La solución de ácido crómico, se preparó agregando a 2,66 g de óxido crómico, 2,30 g de ácido sulfúrico concentrado, y se llevó el volumen a 10 ml con agua destilada.

Se disolvieron 92 mg de germanicol (p.f. 176-177°) en 30 ml de acetona. A esta solución, agitada mecánicamente, se le agregó con una microbureta, la solución de ácido crómico, hasta que se mantuvo un ligero color naranja persistente (0,3 ml). El exceso de ácido crómico se destruyó por adición de etanol, se diluyó con 30 ml de agua y se extrajo el precipitado producido, con éter etílico (3 x 50 ml). El extracto etéreo lavado y secado, se evaporó a presión reducida, y el producto obtenido (85 mg, 92%), recristalizado de benceno-alcohol (3:1), dió láminas brillantes de germanicono de p.f. 184-185°. Lit. Dupont y Julia (1947), 186°; González y Mora (1952), 185-186°.

I.R. (nujol): 1680 (carbonilo de cetona); 850 cm^{-1} (doble unión). Fig. 27
R.M.P. (CDCl_3): 0,75; 0,94; 0,96; 1,03; 1,07; 1,11 (24 H, m, 8 x CH_3^-);

4,86 (1 H, s, H-C_{19}) ppm. Figura 28).

Los datos del espectro de R.M.P. coincidieron con los registrados en la literatura (González et.al., 1971).

Transformación en medio ácido de acetato de germanicol. A una suspensión de 50 mg de acetato de germanicol (p.f. 272-274°) en 40 ml de ácido acético glacial, se agregaron 1,3 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se calentó a reflujo en baño de aceite, durante 3 hs. Luego de ese período, se diluyó la solución con 40 ml de agua destilada y luego de neutralizar, se extrajo con cloroformo (4 x 30 ml). Los extractos clorofórmicos reunidos, se secaron sobre sulfato de sodio, y se evaporó el solvente. El sólido obtenido (43 mg), de p.f. crudo 182-189° y homogéneo por cromatografía en capa delgada, fue recrystalizado de alcohol 4 veces, para dar placas brillantes de p.f. 203-205° que dieron el mismo Rf que el producto de partida en 3 sistemas de solventes distintos. (Sistemas VIII, IX y X).

Este producto de p.f. 203-205°, estudiado por cromatografía gas-líquido, mostró ser mezcla de dos componentes en proporción aproximadamente equimolecular, uno de los cuales mostró un tiempo de retención similar al del acetato de germanicol original. (Tr, 9,37 min.).

Los intentos de separación de esta mezcla por cristalización o métodos cromatográficos, no fueron efectivos.

Cuando se repitió la experiencia anterior con germanicol, tanto en las condiciones anteriores, como empleando cloruro de hidrógeno

seco, que se hizo pasar a través de la solución clorofórmica del compuesto que se deseaba transformar, el producto crudo aislado, luego de diluir con agua la mezcla de reacción, recristalizado de etanol, dio placas brillantes de p.f. 207-209°. Su estudio cromatográfico por c.g.l. mostró la presencia de dos sustancias en relación aproximadamente equimolecular, una de las cuales tenía un Tr similar al del germanicol de partida.

En este caso, tampoco pudo conseguirse la separación de los componentes de la mezcla, tarea en la cual se continúa trabajando.

Hidrólisis alcalina del Residuo I

Una parte del Residuo I (50 g) fue reflujaada con agitación, con una solución de 50 g de HOK en 50 ml de agua, 700 ml de etanol y 150 ml de benceno, durante 4 hs.

Se enfrió y se separó por filtración, un material gomoso insoluble que se descartó.

La solución alcalina, se concentró hasta un volumen aproximado de 250 ml, se diluyó a continuación con agua hasta un volumen final de 2,5 lts, y luego se extrajo el insaponificable con éter etílico (6 x 100 ml).

Los extractos acuosos combinados, fueron acidificados (pH 2), precipitando una mezcla de ácidos sólidos de bajo punto de fusión (2,2 g) que se separaron y estudiaron posteriormente.

La solución etérea, lavada hasta neutralidad y secada, fue evaporada, y se obtuvo un sólido (7,6 g), soluble en benceno, que analizado por c.c.d. (sílica gel, cloroformo), mostró contener dos productos que dieron positiva la reacción de Liebermann-Burchard, de Rf 0,30 (color violeta) y Rf 0,18 (color verde azulado), que demostraron ser, germanicol y mezcla de fitosteroles.

Separación y caracterización de germanicol y fitosteroles. Una parte del sólido obtenido (1,5 g), disuelto en 7 ml de una mezcla de éter de petróleo-benceno (8:2), fue cromatografiada en una columna de sílica gel (150 g, 34 x 3 cm), recogiénose fracciones de 20 ml, y eluyéndo-

las con los sistemas de solventes indicados en la Tabla 11.

TABLA 11

Cromatografía en columna de sílica gel de germanicol y fitosteroles.

Fr. N°	solvente elución	relación v/v	masa mg	p.f.	producto obtenido
1-5	éter de petróleo/ benceno	8:2	--		
6-15	"	7:3	187	148-158°	cristales Rf 0,30
16-65	"	6:4	422	138-153°	cristales Rf 0,30
66-115	"	1:1	461	101-115°	cristales Rf 0,30 y 0,17
116-140	"	3:7	115	117-128°	cristales Rf 0,18
141-165	benceno		<u>11</u>		aceite
			1196		

Las fracciones 6 a 65 se reunieron y se evaporaron, separándose un sólido (605 mg) que recrystalizado de acetato de etilo, dio agujas blancas de germanicol de p.f. 176-177°, $[\alpha]_D^{21} = +6,1$. Todos los datos, físicos (p.f. mezcla), y espectroscópicos (I.R., R.M.P. y E.M.) y derivados preparados (acetato y benzoato) coincidieron con los anteriormente descritos para el germanicol.

Las fracciones 116 a 140 reunidas y evaporadas, dieron un sólido, que recrystalizado de etanol, dio agujas de p.f. 139-140°, $[\alpha]_D^{20} = -34,2$ (c. 1,85 cloroformo). Este producto analizado por cro-

matografía gas-líquido (condiciones en Métodos Empleados), mostró ser una mezcla de dos componentes con tiempos de retención relativos (T_{rr}) al colesterol, T_{rr_A} : 1,14 (18%); T_{rr_B} : 1,32 (82%). Estas señales coincidieron con los tiempos de retención relativos de una muestra auténtica conteniendo campesterol y sitosterol respectivamente.

El espectro de masa del producto de p.f. 139-140° coincidió con los datos de Knights (1967) para sitosterol contaminado con impureza de campesterol, como se encontró por c.g.l. y que ya fue comentado en la discusión de la Parte Experimental.

El producto de p.f. 139-140° fue acetilado según la técnica habitual, con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente, obteniéndose un producto que recristalizado de etanol, dio agujas de p.f. 120-121°, $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ (c. 1,12 cloroformo). Los datos de literatura (Nishioka *et.al.*, 1965) para sitosterol y campesterol purificados por c.g.l. son: sitosterol, p.f. 137-138°, $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$; acetato, p.f. 120,5-121,5°, $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$; campesterol, p.f. 158-159°, $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$; acetato, p.f. 144-145°, $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$.

Rf_B: 0,12); c) isoquercitrina (Rf_A: 0,49; Rf_B: 0,28) y d) rutina (Rf_A: 0,46; Rf_B: 0,55).

Parte del papel dio una coloración homogénea de fluorescencia azul (luz UV, 366 nm), donde no se distinguieron manchas intensas.

Fraccionamiento del extracto metanólico. Un litro de la solución metanólica concentrada (contenía 610 g de residuo seco), se evaporó con vacío, añadiendo pequeñas cantidades de agua, hasta eliminación total del metanol. En estas condiciones se produjo un precipitado gomoso, que se mantuvo en suspensión. Se añadió agua con agitación, hasta un volumen de 4 lt.

La suspensión resultante, fue extraída con butanol saturado de agua (6 x 700 ml), obteniéndose dos fases. La fase inferior, predominantemente acuosa (de color amarillo claro), y una superior de color marrón oscuro, que se separaron en la forma habitual.

Las fases superiores reunidas, se lavaron con 700 ml de agua, que se añadieron a las fases acuosas restantes.

Una determinación del residuo, sobre una alícuota de las fases acuosas reunidas, indicaron que las mismas contenían 442 g de sólidos, los cuales no dieron positivo el ensayo de flavonoides, con cloruro férrico y magnesio-ácido clorhídrico, y contenían una cantidad abundante de sales, y fueron descartados.

De la fase superior, se eliminó el butanol, por evaporación con agregado de agua, dando una suspensión acuosa que contenía 170 g de

sólidos totales. Esta suspensión se llevó a un litro con agua, y se extrajo en forma continua con éter etílico durante 6 horas, obteniéndose un extracto etéreo oscuro, cuyo residuo seco fue de 105 g. Al concentrar este extracto, comenzó la precipitación de un sólido, que se filtró cuando se había evaporado el 90% de la solución inicial.

El filtrado, dio por cromatografía bidimensional una mancha con $Rf_A: 0,65$; $Rf_B: 0,0$ correspondiente a clorofila, y no mostró manchas de flavonoides, por lo que se descartó.

El sólido amarillo lavado con metanol 85% pesó 1,82 g y dio por cromatografía bidimensional $Rf_A: 0,44$; $Rf_B: 0,10$, y fue caracterizado como glucoluteolina.

La fase acuosa extraída con éter en la operación anterior, contenía 62 g de residuo seco, fue concentrada a vacío añadiendo butanol y destilando el azeótropo formado con el agua. Durante la evaporación se produjo un nuevo precipitado amarillo, que fue filtrado cuando se había evaporado el 90% de la solución acuosa inicial. El precipitado lavado y secado, pesaba 2,25 g y se comportó cromatográficamente, en forma idéntica a la glucoluteolina separada anteriormente.

Caracterización de glucoluteolina. (3',4',5-trihidroxi-7-O- β -D-glucopiranosil flavona). Los precipitados obtenidos de los extractos etéreo y acuoso, que contenían la misma sustancia, se reunieron y se evaporaron, y el sólido cristalizado de metanol, dio agujas amarillas de p.f. 256-258°. Su p.f. coincidió con el de un producto conteniendo 1,5

moléculas de agua de cristalización, que no se eliminaron por calentamiento a 105°. Literatura, Nakamura et.al. (1936), p.f. 258°.

El punto de fusión de la glucoluteolina, es variable, de acuerdo al solvente de cristalización, así Hattori y Matsuda (1954) dan para el sesquihidrato, un p.f. 233-234° (etanol), y este producto aumenta su p.f. hasta 254° empleando agua con adición de piridina, para su cristalización.

Analizada por co-cromatografía en capa delgada con una muestra auténtica, dio: Avicel, Sist. I, Rf: 0,12; Sist. II, Rf: 0,48. Poliamida: Sist. VI, Rf: 0,35. Cromatografía bidimensional: Rf_A: 0,39; Rf_B: 0,10.

Propiedades espectroscópicas

U.V. (MeOH) $\lambda_{\text{máx.}}$: 255 (log. ϵ 4,35); 266 inflexión (4,31); 349 (4,34). MeONa): 267; 299 inf.; 403. (Cl₃Al): 279; 295 inf. 331; 427. (Cl₃Al/ClH): 275; 292 inf.; 358; 383. (AcONa): 260; 265 inf.; 405. (AcONa/BO₃H₃): 259; 374 nm. (Proc. I).

Los máximos de absorción y los desplazamientos de los mismos por el agregado de los reactivos mencionados, coinciden con los indicados por Mabry et.al. (1970, p.9).

I.R. (nujol): 3300 (hidroxilo); 1670 (cetona aromática); 798, 730 cm⁻¹ (aromático).

R.M.P. (Cl₄C): corresponde al TMS éter derivado de glucoluteolina: 3,46 (3 H, m, glucosilo); 3,74 (3 H, m, glucosilo); 4,90

(1H, m, glucosilo $\underline{\text{H-C}}_1$); 6,30 (1 H, d, J_{6-8} : 2,3 Hz, $\underline{\text{H-C}}_6$);
 6,42 (1 H, s, $\underline{\text{H-C}}_3$); 6,62 (1 H, d, J_{6-8} : 2,3 Hz, $\underline{\text{H-C}}_8$);
 6,85 (1 H, c, $J_{5'-6'}$: 9 Hz, $J_{5'-2'}$: 1 Hz, $\underline{\text{H-C}}_{5'}$); 7,38 (2 H,
 t, $J_{5'-6'}$: 9 Hz; $J_{2'-6'}$: 2,3 Hz, $\underline{\text{H-C}}_{6'}$, $\underline{\text{H-C}}_{2'}$).

Las señales correspondientes, coinciden con las descritas en la literatura, Mabry et.al. (1970, p. 285).

Recuperación de glucoluteolina. Al residuo TMS éter de glucoluteolina, obtenido por evaporación a seco de la solución de Cl_4C , se le agregó 1 ml de metanol 50% y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. El producto precipitado, se filtró, lavó e identificó como glucoluteolina. (p.f., p.f.m. y co-cromatografía fueron los indicados anteriormente, demostrando que no se había descompuesto el producto).

Heptaacetato de glucoluteolina. Se siguió el método empleado por Tira et.al. (1969). A una solución de 70 mg de glucoluteolina en 0,5 ml de piridina, se le agregó 0,8 ml de anhídrido acético, y se dejó durante 12 hs a temperatura ambiente. Luego la solución se volcó sobre una mezcla de hielo y agua (5 ml) de la cual se filtró el heptaacetato, que recristalizado de etanol dio agujas blancas de p.f. 239-241°. Literatura Tira et.al. (1969), p.f. 228-231°.

U.V. (EtOH) $\lambda_{\text{máx.}}$: 253; 265 inf.; 351 nm.

I.R. (nujol): 1730; 1240 cm^{-1} (acetato).

R.M.P. (CDCl_3): 2,06 (12 H, s, 4 x CH_3CO_2 -glucosilo); 2,32 (3H, s,

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-C}_4$); 2,34 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-C}_3$); 2,43 (3 H, s, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-C}_5$); 4,23 (2 H, m, H de C_1 y C_5 de glucosilo); 5,30 (3 H, s, H de $\text{C}_2, 3$ y 4 de glucosilo); 6,60 (1 H, s, H-C_3); 6,73 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, H-C_6); 7,04 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, H-C_8); 7,38 (1 H, d, $J_{5'-6'}$: 9 Hz, $\text{H-C}_{5'}$); 7,77 (1 H, c, $J_{5'-6'}$: 9 Hz, $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz; H-C_6); 7,75 (1 H, d, $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz; H-C_2) ppm.

Las señales correspondientes coinciden con las descritas en la literatura, Tira et.al. (1969).

Tri-O-metil luteolina. A una solución de 43 mg de glucoluteolina en 3 ml de metanol, se le agregaron 3 ml de una solución de diazometano en éter. La mezcla se mantuvo refrigerada (5°) durante 24 hs con agitación ocasional, añadiendo mas solución de diazometano, hasta persistencia de color amarillo. En el transcurso de esta operación, apareció un sólido cristalino que se separó por filtración (20 mg), y fue hidrolizado con ClH 2N (5 ml) por calentamiento a reflujo durante una hora. El sólido que se separó al enfriar, fue filtrado y recristalizado de metanol, dio cristales amarillentos de p.f. 280-282°. Hattori y Matsuda (1954) p.f. 284°.

U.V. (MeOH) $\lambda_{\text{máx.}}$: 254; 269 inf.; 298 inf.; 358 nm.

I.R. (nujol): 3350 (hidroxilo); 2800; 1250 cm^{-1} (éter).

R.M.P. (CDCl_3): 3,88; 3,91; 3,95 (9 H, 3 s, 3 x $\text{CH}_3\text{O-}$); 6,15 (1 H, d,

J_{6-8} : 2,5 Hz, $H-C_6$); 6,30 (1 H, s, $H-C_3$); 6,48 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, $H-C_8$); 6,85 (1 H, d, $J_{5'-6'}: 8$ Hz, $H-C_{5'}$); 7,30 (1 H, d, $J_{2'-6'}: 2,5$ Hz, $H-C_{2'}$); 7,39 (1 H, c, $J_{5'-6'}: 8$ Hz, $J_{2'-6'}: 2,5$ Hz, $H-C_{6'}$)

Hidrólisis ácida del glicósido. Una solución de 300 mg de glucoluteolina en 30 ml de ácido clorhídrico 2N fue calentada a reflujo durante una hora. La suspensión resultante se filtró y lavó. Se obtuvieron 189 mg de un producto (rendimiento 98,5%), que recristalizado de etanol, dio agujas amarillas de luteolina de p.f. 328-330°. Perkin (1896), p.f. 330-331°.

El punto de fusión de una mezcla con una muestra auténtica, no mostró depresión. Analizada por co-cromatografía en capa delgada dio: Avicel: Sist. I, R_f : 0,05; Sist. II, R_f : 0,44. Poliamida: Sist. VI, R_f : 0,30. Cromatografía bidimensional: R_{fA} : 0,54; R_{fB} : 0,03.

Propiedades espectroscópicas

U.V. (MeOH) $\lambda_{\text{máx.}}$: 253 ($\log \epsilon$ 4,66); 267 inf. (3,82); 293 inf. (4,37); 349 (4,42). (MeONa): 269; 325 inf.; 400. (Cl_3Al): 275; 302 inf. 332 inf.; 422. (Cl_3Al/ClH): 276; 298 inf.; 360; 386. (AcONa): 269; 325 inf.; 401. (AcONa/ BO_3H_3): 260; 370; 430 inf. nm. (Proc. I).

I.R. (nujol): 3350 (hidroxilo); 1670 (carbonilo aromático); 850 cm^{-1}

R.M.P. (Cl_4C): corresponde al TMS éter derivado de luteolina:

6,12 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, $H-C_6$); 6,30 (1 H, s, $H-C_3$);
 6,46 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, $H-C_8$); 6,82 (1 H, d, $J_{5'-6'}$: 8 Hz,
 $H-C_5$); 7,28 (1 H, d, $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz, $H-C_2$); 7,37 (1 H, c,
 $J_{5'-6'}$: 8 Hz; $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz, $H-C_6$).

La posición de las señales coincide con las señaladas por Mabry et.al. (1970, p. 263)

Tetra acetil luteolina. Fue preparada adaptando el método ya indicado de Tira et.al. (1969), con anhídrido acético y piridina. El sólido amorfo obtenido, recristalizado de benceno, dio agujas blancas de p.f.

223-224°. Nakaoki et.al. (1961) p.f. 222-223°.

I.R. (nujol): 1730; 1235 cm^{-1} (acetato).

R.M.P. ($CDCl_3$): 2,30 (3 H, s, CH_3CO_2-); 2,33 (6 H, s, 2 x CH_3CO_2-);
 2,43 (3 H, s, CH_3CO_2-); 6,61 (1 H, s, $H-C_3$); 6,89 (1 H, d,
 J : 2,5 Hz, $H-C_6$); 7,33 (1 H, d, J_{6-8} : 2,5 Hz, $H-C_8$); 7,45
 (1 H, d, $J_{5'-6'}$: 9 Hz, $H-C_5$); 7,71 (1 H, d, $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz,
 $H-C_2$); 7,85 (1 H, c, $J_{5'-6'}$: 9 Hz; $J_{2'-6'}$: 2,5 Hz, $H-C_6$).

La posición de las señales coincide con las señaladas por Koeppen y Roux (1965).

Tetra metil luteolina. A una suspensión de 25 mg de luteolina en 5 ml de metanol, se le agregó en porciones 10 ml de una solución de diazometano en éter. La mezcla se mantuvo refrigerada (5°) durante

48 hs. con agitación ocasional. Por filtración, se separó un sólido amarillo pálido, que recristalizado de alcohol-agua, dio agujas de p.f. 190-191°. literatura, Narasimbachari y Seshadri (1949), p.f. 190-192°.

Propiedades espectroscópicas

R.M.P. (CDCl₃): 3,92 (3 H, s, CH₃O-); 3,99 (9 H, s, 3 x CH₃O-); 6,37 (1 H, d, J₆₋₈: 2,5 Hz, H-C₆); 6,51 (1 H, d, J₆₋₈: 2,5 Hz, H-C₈); 6,59 (1 H, s, H-C₃); 6,92 (1 H, d, J_{5'-6'}: 8 Hz, H-C_{5'}); 7,28 (1 H, d, J_{2'-6'}: 2,5 Hz, H-C_{2'}); 7,49 (1 H, c, J_{5'-6'}: 8 Hz, J_{2'-6'}: 2,5 Hz, H-C_{6'}) ppm.

Caracterización de glucosa. El filtrado obtenido de la hidrólisis ácida del glicósido (105 mg), llevado a seco, reveló la presencia de glucosa por co-cromatografía en placa delgada, Rf: 0,39 (Avicel, Sist. IV, revelador: bencidina-ácido tricloroacético, Bacon y Edelman (1951)) y además, comparación con una muestra auténtica, por cromatografía gaseosa, Tr: 10,1 min. (Condiciones indicadas anteriormente).

La solución acuosa restante, obtenida del extracto metanólico, por extracción, primero con butanol y luego éter, volvió a dar las cuatro manchas características de los flavonoles y los glicoflavonoles que contenía al comienzo de su tratamiento. Su separación se efectuó mediante el empleo de una columna de poliamida, como se indica a continuación:

Cromatografía de la solución acuosa de flavonoides. Una parte de la solución acuosa (extraída con butanol y con éter etílico), conteniendo 2,3 g de residuo, se disolvió en 20 ml de agua, y la solución resultante se hizo pasar por una columna cromatográfica de poliamida (100 g, 5 x 43 cm) preparada como se indicó en Métodos Empleados. A continuación se eluyó con los sistemas de solventes indicados en la Tabla 12. Se recogieron fracciones de 33 ml en un colector automático, separándose las mismas en base a la variación de las intensidades de absorción de cada fracción (lectura a 280 mμ).

El contenido de las distintas fracciones se estudió por c.c.d. (Avicel, Sist. I), y cromatografía bidimensional en papel. Según las condiciones empleadas, los flavonoides comenzaron a eluirse con metanol 50%.

Caracterización de rutina y luteolina. Fracciones 101-123.

Esta fracción analizada por cromatografía bidimensional, mostró la presencia de un producto de R_{fA} : 0,55; R_{fB} : 0,04, y otro de R_{fA} : 0,45; R_{fB} : 0,58. Estos compuestos fueron separados por cromatografía preparativa en papel, con el sistema de solventes I, y se confirmó la presencia de luteolina (Sist. I, R_f : 0,03) y rutina (Sist. I, R_f : 0,51).

Una parte de las fracciones 101-123 (180 mg), se disolvieron en metanol, y se depositaron en papel Whatmann 3MM para la cromatografía preparativa, tal como se indicó en la parte de Métodos Empleados.

TABLA 12

Cromatografía de la solución acuosa de flavonoides en columna de poliamida

Fr. N°	Solvente	peso mg	reacción (x)	producto obtenido
1-9	agua	-		
10-76	MeOH 20%	700	(-)	aceite fluorescente azul
77-91	" 30%	90	(-)	
92-100	" 40%	60	(±)	
101-123	" 50%	256	(+)	sólido amarillo (rutina y luteolina)
124-147	" 50%	300	(+)	sólido amarillo (rutina isoquercitrina y glucoluteolina)
148-171	" 75%	78	(+)	sólido amarillo (isoquercitrina e impurezas)
172-195	" 75%	62	(+)	sólido amarillo (isoquercitrina)
196-225	" 100%	8	(+)	aceite.
226- 234	ClH 0,5 N	10	(-)	
235-248	ClH 1 N			aceite espeso oscuro

(x) reacción para fenoles con magnesio y ácido clorhídrico.

Se desarrollaron los papeles hasta 2 cm del extremo inferior, y luego se evaporó el solvente a temperatura ambiente. Las dos bandas que contenían los productos fenólicos, se separaron del papel y se cortaron en trozos pequeños que fueron **extraídos** con metanol acuoso (85:15), repitiéndose este proceso hasta reacción negativa de flavonoides.

Luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxi flavona). La evaporación del solvente, a presión reducida, del eluido de la banda de R_f : 0,03, dio agujas amarillo pálido de p.f. 330-331° idénticas a las obtenidas por hidrólisis de glucoluteolina. (p.f.m.; co-crom.; U.V.; I.R. superponible).

Rutina (3',4',5,7-tetrahidroxi-3-(6-O- α -L-rhamnopiranosil- β -D-glucopiranosil)-flavona. La evaporación del solvente del eluido de la banda de R_f : 0,51, dio un sólido amarillo, que recristalizado de agua, dio agujas amarillas de p.f. 190-192° que coincidió con los datos registrados en la literatura, para rutina con 3 moléculas de agua de cristalización. $[\alpha]_D^{20} = -40,4$ (c: 0,861, piridina). Hörhammer *et.al.* (1966), quien hizo una síntesis de rutina, obtuvo p.f. 188-190°, $[\alpha]_D^{25} = -36,9$.

Su identidad fue confirmada por co-cromatografía en capa fina, Avicel, Sist. I, R_f : 0,51; Sist. II, R_f 0,59; Poliamida, Sist. VI R_f : 0,52. Cromatografía bidimensional, R_{fA} : 0,46; R_{fB} : 0,55.

Sus propiedades espectroscópicas (U.V., I.R. y R.M.P.), coincidieron con las registradas en la literatura.

Hidrólisis ácida de rutina. Una solución de 250 mg de rutina en 15 ml de metano., fue calentada a reflujo con 15 ml de ácido sulfúrico 4% durante dos horas. El producto de la reacción se enfrió, primero a temperatura ambiente, y luego en baño de hielo, obteniéndose un sólido amarillo que se filtró y lavó con agua hasta neutralidad. Recristalizado de etanol 70% dio agujas de quercetina (102 mg, 98%), de p.f. 300-301°. El punto de fusión mezcla con una muestra auténtica no dio depresión.

Sus propiedades espectroscópicas (U.V.; R.M.P.), coincidieron con las registradas en la literatura.

El filtrado de la solución de hidrólisis, fue cromatografiado en capa delgada (Avicel, Sist. IV, revelador, biftalato de anilina). Dio dos manchas de Rf: 0,49 y 0,61 que corresponden a glucosa y ramnosa respectivamente. El análisis por cromatografía gas-líquido (glucosa, Tr: 10,10 min; ramnosa, Tr: 5,66 min; condiciones ya indicadas anteriormente), corroboró el resultado anterior, indicando, sus áreas relativas, una relación 1:1 entre ambos azúcares.

Penta acetil quercetina. A 43 mg de la quercetina obtenida por hidrólisis de rutina, fueron tratados en la forma habitual. Recristalizada de metanol, dio agujas blancas de p.f. 190-192°. Nakamura et.al.

(1936) dio p.f. 188-190°

I.R. (nujol): 1730 cm^{-1} (éster alifático).

R.M.P. (CDCl_3): 2,32 (12 H, s, $4 \times \text{CH}_3\text{CO}_2^-$); 2,42 (3 H, s, CH_3CO_2^-)

en C₃); 6,87 (1 H, d, J₆₋₈: 2 Hz, H-C₆); 7,33 (1 H, d, J₆₋₈: 2 Hz, H-C₈); 7,33 (1 H, d, J_{5'-6'}: 9 Hz, H-C_{5'}); 7,69 (1 H, d, J_{2'-6'}: 2 Hz, H-C_{2'}); 7,74 (1 H, c, J_{5'-6'}: 9 Hz; J_{2'-6'}: 2 Hz, H-C_{6'}) ppm.

Caracterización de Isoquercitrina. (3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-β-D-glucopiranosil flavona). Análisis de la fracción 172-195.

Estas fracciones analizadas por cromatografía bidimensional, mostraron la presencia de un producto con Rf_A: 0,49 y Rf_B: 0,28.

Su purificación se efectuó depositando hasta 180 mg de sólido en solución metanólica en papel Whatmann 3MM, que fue eluido con el sistema de solventes I. La banda conteniendo isoquercitrina (Rf: 0,30) se separó del papel, y se eluyó con metanol 85%.

La evaporación del metanol a presión reducida, dio 413 mg de un sólido que recristalizado de metanol acuoso (70%), dio agujas amarillo pálido de p.f. 221-223°, que corresponde a un producto con 4 moléculas de agua de cristalización. $[\alpha]_D^{22} = -36,62$ (c: 0,66, piridina). El punto de fusión mezcla con una muestra auténtica no mostró depresión. Hörhammer et al., (1968) quienes hicieron su síntesis dieron p.f. 217-218°, $[\alpha]_D^{26} = -38,47$. Sando y Bartlett (1922) dieron p.f. 220-222° para una muestra aislada de Zea mays.

Analizada por co-cromatografía en capa delgada, dio: Avicel, sist. I, Rf: 0,35; sist. II, Rf: 0,60; Poliámidas, sist. VI, Rf: 0,35. Cromatografía bidimensional: Rf_A: 0,49; Rf_B: 0,35.

en C₃); 6,87 (1 H, d, J₆₋₈: 2 Hz, H-C₆); 7,33 (1 H, d, J₆₋₈: 2 Hz, H-C₈); 7,33 (1 H, d, J_{5'-6'}: 9 Hz, H-C_{5'}); 7,69 (1 H, d, J_{2'-6'}: 2 Hz, H-C_{2'}); 7,74 (1 H, c, J_{5'-6'}: 9 Hz; J_{2'-6'}: 2 Hz, H-C_{6'}) ppm.

Caracterización de Isoquercitrina. (3',4',5,7-tetrahidroxi-3-O-β-D-glucopiranosil flavona). Análisis de la fracción 172-195.

Estas fracciones analizadas por cromatografía bidimensional, mostraron la presencia de un producto con Rf_A: 0,49 y Rf_B: 0,28.

Su purificación se efectuó depositando hasta 180 mg de sólido en solución metanólica en papel Whatmann 3MM, que fue eluido con el sistema de solventes I. La banda conteniendo isoquercitrina (Rf: 0,30) se separó del papel, y se eluyó con metanol 85%.

La evaporación del metanol a presión reducida, dio 413 mg de un sólido que recristalizado de metanol acuoso (70%), dio agujas amarillo pálido de p.f. 221-223°, que corresponde a un producto con 4 moléculas de agua de cristalización. $[\alpha]_D^{22} = -36,62$ (c : 0,66, piridina). El punto de fusión mezcla con una muestra auténtica no mostró depresión. Hörhammer et.al., (1968) quienes hicieron su síntesis dieron p.f. 217-218°, $[\alpha]_D^{26} = -38,47$. Sando y Bartlett (1922) dieron p.f. 220-222° para una muestra aislada de Zea mays.

Analizada por co-cromatografía en capa delgada, dio: Avicel, sist. I, Rf: 0,35; sist. II, Rf: 0,60; Poliamida, sist. VI, Rf: 0,35. Cromatografía bidimensional: Rf_A: 0,49; Rf_B: 0,35.

Sus propiedades espectroscópicas (U.V., R.M.P.) coincidieron con las descritas en la literatura (Hörhammer et.al., 1968).

Hidrólisis ácida de isoquercitrina. Una solución de 50 mg de isoquercitrina en 5 ml de ácido clorhídrico 2N, fue calentada a reflujo durante 2 horas. Luego se enfrió, precipitando un sólido amarillo. Recristalizado de etanol 70%, dio quercetina de p.f. 310-313° la cual coincidió en todas sus propiedades físicas y espectroscópicas con la quercetina obtenida anteriormente.

ESTUDIO DEL LÁTEX DE FRUTOS DE M. BRACHYSTEPHANA

Se obtuvo el látex, tomando frutos frescos y maduros, a los cuales se le eliminaron las semillas. El resto fue prensado, obteniéndose un líquido de color blanco, viscoso, de aspecto lechoso.

A 130 ml de látex, se agregaron 230 ml de alcohol, y se calentó a ebullición. La suspensión se filtró en caliente, obteniéndose una solución hidroalcohólica de color amarillo pálido y un sólido resinoso amarillo, que se descartó.

Por enfriamiento del filtrado anterior, y al concentrar, precipitó un sólido blanco cristalino (4,73 g) que analizado por c.c.d. mostró la presencia de varios componentes que dieron positiva la reacción de Liebermann-Burchard, y con Rf 0,70; 0,58 (el mas importante) y 0,32 (sílica gel-cloroformo).

Estos componentes fueron separados por pasaje a través de una columna cromatográfica de sílica gel, en condiciones similares a las indicadas anteriormente en las Tablas 8 y 10. Se obtuvieron los siguientes productos, que fueron identificados a través de las constantes físicas que se indican: a) Rf 0,70: trans-cinamato de germanicol (1630 mg), p.f. 248-250°; $[\alpha]_D^{18} = +8,7$; co-cromat., p.f.m., I.R. superponible; b) Rf 0,58: acetato de germanicol (2380 mg), p.f. 272-274°, $[\alpha]_D^{18} = +18,0$; co-cromat., p.f.m., I.R. superponible; c) Rf 0,32: germanicol (245 mg), p.f. 176-177°; $[\alpha]_D^{18} = +6,9$; co-cromat., p.f.m., I.R. superponible.

B. Morrenia conectens Malme

Una muestra de la parte aérea, molida y seca (1500 g), obtenida en la ciudad de Formosa, se trabajó como se indicó para M. brachystephana.

La extracción con solventes, dio un Extracto en éter de petróleo, 102,3 g (6,8%); un Extracto en cloroformo, 34,5 g (2,3%) y un Extracto en metanol, 255 g (17,1%).

Los tres extractos fueron estudiados prácticamente en la misma forma que se indicó anteriormente.

Extracto en éter de petróleo. Este extracto fue fraccionado en una columna de sílica gel similar a la descrita en la Tabla 8.

Las primeras fracciones dieron una mezcla de hidrocarburos, que se cristalizaron como se indicó y que analizada por c.g.l. dio: C₂₇, 2,8%; C₂₈, 1,3%; C₂₉, 8,2%; C₃₀, 2,6%; C₃₁, 39,7%; C₃₂, 6,5%; C₃₃, 33,3%.

Las fracciones eluidas con una mezcla de éter de petróleo/benceno en relación 8:2 se cromatografiaron en una columna de sílica gel similar a la descrita en la Tabla 10, de la cual se aislaron: trans-cinamato de germanicol, p.f. 248-250° (acetato de etilo); $[\alpha]_D^{20} = +8,33$ (c: 2,21 cloroformo); co-cromat., p.f.m., I.R. superponible, y acetato de germanicol, p.f. 271-272° (acetona); $[\alpha]_D^{20} = +17,2$ (c: 2,51 cloroformo); co-cromat., p.f.m., I.R. superponible.

Las fracciones eluidas con benceno-cloroformo 1:1, dieron germanicol, p.f. 175-176° (acetona); $[\alpha]_D^{19} = +5,3$ (c: 2,30 cloroformo); co-cromatografía, p.f.m., I.R. superponible.

El producto de la hidrólisis básica, de una parte del extracto en éter de petróleo, cromatografiado en una columna de sílica gel similar a la indicada en la Tabla 11, permitió aislar la fracción de fitosteroles. Su identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención relativos al colesterol (T_{RR}) en cromatografía gas-líquido. Se determinó la presencia de sitosterol y campesterol en una proporción aproximada de 8:2.

Extracto en cloroformo. El contenido del mismo, no fue analizado, según lo explicado para M. brachystephana (reacción negativa de alcaloides y de glicósidos cardenolidos) y fue descartado.

Extracto en metanol. Este extracto, estudiado por cromatografía bidimensional en papel, mostró la presencia de cuatro flavonoides con R_f idénticos a los encontrados en M. brachystephana.

Luego de efectuar una partición con solventes, como la anteriormente descrita, combinando la cromatografía en columna de poliamida con cromatografía preparativa en papel, se aislaron: a) glucoluteolina, p.f. 256-258° (metanol), p.f.m., co-cromat. en 3 sistemas (Sist. I, II y VI); U.V. (con agregado de reactivos específicos). Su hidrólisis dio luteolina, p.f. 325-328°, co-cromat., U.V., y glucosa, co-cromat. y c.g.l.; b) rutina: p.f. 189-191°, $[\alpha]_D^{22} = -41,3$ (c: 1,12 piridina); p.f.m. co-cromat. en 3 sistemas; U.V. (con agregado de reactivos específicos); su hidrólisis ácida, condujo a quercetina, co-cromat.; U.V. y ramnosa y glucosa, co-cromat., c.g.l.

La identificación de luteolina e isoquercitrina, componentes flavonoides minoritarios, presentes en este extracto, se realizó por cromatografía en 3 sistemas de solventes (además de cromatografía bidimensional), y por los espectros de absorción U.V., y el comportamiento de los mismos por adición de los reactivos habituales, que coincidió con los de muestras auténticas.

C. Morrenia odorata (Hook. et Arn.) Lindley

Una muestra de la parte aérea de esta especie (1800 g), molida y seca, se procesó como en los casos mencionados anteriormente.

La extracción con solventes, dio un extracto en éter de petróleo, 77,4 g (4,3%); un extracto en cloroformo, 32,4 g (1,8%) y un extracto en metanol, 306 g (17%). Como en los casos anteriores, el extracto en cloroformo fue descartado.

Extracto en éter de petróleo. El contenido de este extracto fue fraccionado en columnas de sílica gel, como ya se ha indicado. Las primeras fracciones eluidas con éter de petróleo, dieron una mezcla de hidrocarburos lineales de p.f. 66-69°, cuyo contenido estudiado por c.g.l. fue: C₂₅, 4,3%; C₂₇, 3,8%; C₂₈, 1,5%; C₂₉, 10,4%; C₃₀, 1,9%; C₃₁, 51,7%; C₃₂, 1,9%; C₃₃, 17,7%.

La elución con solventes de polaridad creciente, permitió aislar: a) cinamato de germanicol, p.f. 240-245°, $[\alpha]_D^{21} = +8,90$ (c: 3,0 cloroformo); co-cromat., p.f.m., I.R. superponible; R.M.P.; b) acetato de germanicol, p.f. 266-270°, $[\alpha]_D^{20} = +18,0$; co-cromat., p.f.m., I.R. superponible; c) germanicol, p.f. 266-270°, $[\alpha]_D^{18} = +5,9$ (c: 3,0 cloroformo); co-cromat., p.f.m., I.R. superponible; d) mezcla de sitosterol y campesterol, identificada por comparación de sus tiempos de retención relativos al colesterol por c.g.l.

Extracto en metanol. Este extracto mostró por cromatografía bidimensional en papel, la presencia de 4 flavonoides que son los mismos encon-

trados en M. brachystephana según sus Rf.

Se hizo la partición habitual de este extracto, con butanol-agua, y por cromatografía en papel preparativa, se aislaron: glucoluteolina, p.f. 244-246°; p.f.m.; co-cromatografía; U.V.; rutina, p.f. 187-192°, $[\alpha]_D^{20} = -40,2$ (c: 0,8, piridina), p.f.m., co-cromatografía; U.V.; luteolina e isoquercitrina, fueron identificados por co-cromatografía (Sistemas I, II y VI), y espectroscopía U.V. con posterior agregado de los reactivos habituales.

D. OTRAS ESPECIES DE MORRENIA.

De algunas especies de Morrenia, sólo se pudo disponer de pequeñas muestras, por lo que fue necesario aplicar procedimientos que permitieran una mayor sensibilidad en la detección de los componentes similares a los aislados en las especies ya indicadas, o compuestos relacionados.

Con la experiencia adquirida en las tres especies de Morrenia anteriores, se desarrolló un método, que luego se aplicó en forma sistemática, donde se combinan las diversas técnicas cromatográficas, que demostró ser lo suficiente sensible como para poder analizar muestras de 1 g o mayores.

METODO. 5 g del vegetal seco y molido (parte aérea), se extrajeron en Soxhlet hasta agotar, en forma sucesiva con éter de petróleo, cloroformo y metanol (100 ml de cada uno) (aproximadamente 3, 4 y 6 hs respectivamente).

Extracto en éter de petróleo. Una parte del residuo de la evaporación del solvente (100 mg aprox.) se disolvieron en 3 ml de éter de petróleo y fue cromatografiado en una columna seca de sílica gel (10 g, 12 x 1 cm), recogiendo fracciones de 5 ml, con los siguientes sistemas de solventes: éter de petróleo (30 ml); éter de petróleo-benceno, 1:1, (40 ml); benceno (40 ml); cloroformo (40 ml) y metanol (40 ml). Las fracciones con igual contenido, se reunieron, estudiándose individualmente, por c.c.d. y c.g.l. comparándose los Rf y Tr de sus componentes

con muestras puras.

La cromatografía preparativa en placa delgada (500 u), de estas fracciones, permitió obtener en algunos casos, sustancias puras para el análisis por métodos espectroscópicos y determinación de sus constantes físicas.

Otra parte del extracto en éter de petróleo (50-100 mg), se hidrolizó en una mezcla de hidróxido de potasio en etanol (10%), 20 ml, y 10 ml de benceno, durante 3 horas a reflujo. Luego la solución se acidificó, y se extrajo con cloroformo, se secó el extracto clorofórmico con sulfato de sodio y después de evaporar el solvente, se estudió su contenido por c.c.d. y c.g.l.

Extracto en cloroformo. Sobre este extracto se hicieron ensayos de alcaloides y glicósidos cardiotónicos, ya mencionados. Para el caso de las Morrenias, al obtenerse resultados negativos para ambos tipos de sustancias, el extracto se descartó.

Extracto en metanol. Luego de concentrarlo a 1/5 del volumen inicial, fue cromatografiado en placa delgada de celulosa (Sistemas I y II), poliamida (Sistema VI) y cromatografía bidimensional en papel (c.b.p.) Se compararon los Rf con los de muestras puras de glicósidos flavonoides y agliconas.

Cuando no hubo superposición de manchas en la c.b.p., éstas se cortaron y se eluyeron con metanol, empleándose la solución, luego de concentrarla, para obtener el espectro U.V. y estudiar su comportamiento frente al agregado de los distintos reactivos de desplazamiento. (Ver en Métodos Empleados, Espectros de Absorción Ultravioleta).

Siguiendo procedimientos análogos a los recién descritos, se analizaron pequeñas muestras de todas las especies recibidas, y en particular se aplicaron al estudio de M. Schulziana, M. stormiana y M. stuckertiana.

Los resultados encontrados, son similares a los descritos para las especies anteriores, observándose un predominio del trans-cinamato de germanicol frente al acetato y al alcohol libre; mientras que en el extracto en metanol, se observó la ausencia total o parcial de los flavonoides del grupo de la luteolina.

COMPUESTOS IDENTIFICADOS

Alcanos. Los porcentajes relativos para las tres especies, según el estudio por c.g.l., se transcriben en la Tabla 13.

TABLA 13

Alcanos identificados en M. schulziana, M. stormiana y M. stuckertiana

nº át. de C.	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
M. schulziana	1,13	0,5	2,1	1,7	2,8	2,0	4,7	2,7	44,2	4,6	27,6
M. stormiana	0,9	0,5	2,5	1,7	5,0	1,6	6,7	2,4	47,8	4,5	23,5
M. stuckertiana	0,7	—	2,9	—	7,3	1,2	8,8	2,1	51,5	4,3	19,5

Triterpenos y fitosteroles. Se aislaron los mismos productos ya descritos para las otras especies de *Morrenia*.

Para M. stormiana y M. stuckertiana, se pudieron purificar mues-

tras de t-cinamato de germanicol sobre las que se hicieron constantes físicas.

De la hidrólisis básica se aisló en todos los casos germanicol, cuyas constantes coincidieron con las anteriormente descritas.

Las 3 especies contienen mezclas de fitosteroles en pequeña proporción, y por comparación de sus *Tr* en cromatografía gas-líquido, se identificaron sitosterol y campesterol.

Flavonoides. Empleando métodos cromatográficos como se describió antes, se identificaron los compuestos flavonoides indicados en la Tabla 14.

TABLA 14

	Clucoluteolina	Luteolina	Rutina	Isoquercitrina
<i>M. schulziana</i>	-	-	+	+
<i>M. stormiana</i>	-	-	+	+
<i>M. stuckertiana</i>	+	-	+	+

Se efectuó en todos los casos co-cromatografía con compuestos puros y los espectros de absorción ultravioleta, con el eluido de la cromatografía bidimensional.

En ninguna de las tres especies se detectó otro tipo de compuestos flavonoides.

APENDICE

DATOS DE RECOLECCION Y CLASIFICACION DE MUESTRAS REPRESENTATIVAS DE
LAS ESPECIES VEGETALES ESTUDIADASMorrenia brachystephana Griseb.

SI 26597. Recolectada en mayo y junio de 1972 por el Sr.
Giacopello en las proximidades de la ciudad de Formosa.
Clasif. Ing. Burkart.

SI 26598. Mayo de 1972. Leg. Ing. Beñatena, ciudad de Con-
cordia, Entre Ríos. Clasif. Ing. Burkart.

Morrenia odorata (Hook. et Arn.) Lindley

LIL 513874. Diciembre de 1972. Leg. M. Blanco, ciudad de
Castelar, provincia de Buenos Aires. Clasif. Dr. T. Meyer.
Junio 1973. Leg. Sr. Zeizeneis, ciudad de Bartolomé de las
casas (Formosa). Clasificada Ing. Burkart.

Morrenia conectens Malme

SI 26780. Julio y agosto de 1973. Leg. Giacopello, Formosa
Clasif. Ing. Burkart.

Morrenia schulziana Meyer

SI 26907. Noviembre de 1973. Leg. Dr. Schultz, Colonia Bení-
tez (Chaco). Clasif. Ing. Burkart.

Morrenia stormiana (Morong) Malme

SI 26906. Noviembre de 1973. Leg. Dr. Schultz, Colonia Bení-
tez (Chaco). Clasif. Dr. Schultz.

Morrenia stuckertiana (Kurtz ex Stuckert) Malme

SI 26908. Febrero de 1974. Leg. Dr. Juliani, ciudad de Córdoba. Clasif. Ing. Burkart.

SI son las siglas del Herbario del Instituto de Botánica Darwinion (Buenos Aires) ; LIL son las siglas del herbario del Instituto Miguel Lillo (Tucumán), lugares donde se hallan depositadas las muestras de las especies estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abe, S., Bull. Chem. Soc. Japan, 33, 271 (1960); C.A. 55, 3647 f.
- Abisch, E. y Reichstein, T., Helv. Chim. Acta, 45, 2090 (1962).
- Alston, R.E. y Hagen, C.W., Nature, 175, 990 (1955).
- Ames, T.R., Davy, G.S., Halsall, T.G., Jones, E.R.H. y Meakins, G.D.
Chem. Ind., 741 (1951).
- Anet, F.A.L., Hughes, G.K. y Ritchie, E., Aust. J. Chem., 6, 58 (1953)
- Arata, P.N., Anales Iep. Nac. Higiene, 1(1), 65 (1891).
- Arata, P.N. y Gelzer, C., Ber., 24, 1849 (1891 a).
- Arata, P.N. y Gelzer, C., Ber., 24, 1951 (1891 b).
- Bacon, J.S.D. y Edelman, J. Biochem. J., 48, 114 (1951).
- Baker, E.A. y Martin, J.T., Nature, 199, 1268 (1963).
- Barton, D.H.R. y Brooks, C.J.W., J. Am. Chem. Soc., 72, 3314 (1950).
- Barton, D.H.R. y Brooks, C.J.W., J. Chem. Soc., 257 (1951).
- Barton, D.H.R., Mellows, G., Widdowson, D.A. y Wright, J.J., J. Chem.
Soc. (C), 1142 (1971).
- Barton, G.M., Evans, R.S. y Gardner, J.A.F., Nature, 170, 249 (1952)
- Barz, W., Patachke, L. y Grisebach, H., Chem. Comm., 17, 400 (1965).
- Barz, W. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 21b, 201 (1966 a).
- Barz, W. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 21b, 1113 (1966 b).
- Barz, W. y Hösel, W., Phytochemistry, 10, 335 (1971).
- Bate-Smith, E.C., Proc. Linn. Soc. Lond., 198 (1958).
- Bate-Smith, E.C., J. Linn. Soc. (Bot.), 58, 95 (1962).

- Bate-Smith, E.C., citado por Grisebach, H. en Biosynthetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants, p. 24, John Wiley y Sons, Inc., New York, 1967.
- Beaton, J.M., Spring, F.S., Stevenson, R. y Stewart, J.L., J. Chem. Soc., 2131 (1955).
- Bermejo, J., Bretón, J.L., González, A.G. y Villar del Fresno, A., Anales Real Soc. Fís. Quím., 44, 893 (1968).
- Beri, R. M. y Sharma, O.P., Indian J. Chem., 1, 501 (1963).
- Bhatnagar, A.S., Stöcklin, W. y Reichstein, T., Helv. Chim. Acta, 51, 148 (1968).
- Birch, A.J. y Donovan, F.W., Aust. J. Chem., 6, 360 (1953).
- Bohm, B.A., Chem. Rev., 65, 438 (1965).
- Bowers, A., Halsall, T.G. y Jones, E.R., J. Chem. Soc. 2555 (1953).
- Brandner, G., citado por H. Grisebach en Biosynthetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants, p. 21, John Wiley y Sons, Inc. New York, 1967.
- Brown, R., Mem. Wer. Soc., I, 12 (1809) citado en la monografía de Meyer, T. (1944).
- Budzikiewicz, H., Wilson, J.M. y Djerassi, G., J. Am. Chem. Soc. 85, 3688 (1963).
- Cavill, G.W.K., Dean, F.M., Mc Gookin, A., Marshall, B.M. y Robertson, A., J. Chem. Soc., 4573 (1954).
- Channon, H.J. y Chibnall, A.C., Biochem. J., 23, 168 (1929).
- Cheung, H.T. y Williamson, D.G., Tetrahedron, 25, 119 (1969).

- Chevalier, J. y Goris, M., Bull. de Théraputique, 158, 919 (1910).
- Chibnall, A.C., Piper, S.H., Pollard, A., Williams, E.F. y Sahai, P.N., Biochem. J., 28, 2189 (1934 a).
- Chibnall, A.C. y Piper, S.H., Biochem. J., 28, 2209 (1934 b).
- Chibnall, A.C. y Piper, S.H., Biochem. J. 23, 168 (1929).
- Chow, Y.L. y Quon, H.H., Phytochemistry, 9, 1152 (1970).
- Cohen, M.N.H., Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 28, 368 (1908).
- Crombie, L. y Thomas, M.B., Chem. Comm., 8, 155 (1965).
- Crombie, L., Dewick, P.M. y Whiting, D.A., Chem. Comm., 1469 (1970).
- Crombie, L., Dewick, P.M. y Whiting, D.A., Chem. Comm., 1182 (1971).
- Crowden, R.K., Harborne, J.B. y Heywood, V.H., Phytochemistry, 8, 1969 (1969).
- David, S., Bull. Soc. Chim. France, 16, 155 (1949).
- David, S., Bull. Soc. Chim. France, 17, 169 (1950).
- Del Arca, E.E., Revista de la Sociedad Médica Argentina, I, 189 (1892).
- Dewar, D. y Sutherland, R.G., Chem. Comm. 272 (1970).
- Dewick, P.M., Barz, W. y Grisebach, H., Phytochemistry, 9, 775 (1970).
- Domínguez, J.A., Datos para la Materia Médica Argentina, La Semana Médica, I, 184 (1905).
- Domínguez, J.M., Unidad de Metabolismo y Nutrición, Hospital Tornú, comunicación personal (1973).
- Domínguez, X.A., García Delgado, J., Lourdes Maffey, M., Mares, J.G. y Rombold, C., J. Pharm. Sciences, 56, 1184 (1967).
- Domínguez, X.A. y Vanegas Torres, M., Phytochemistry, 11, 848 (1972).

- Domínguez, X.A., Marroquín, J., Olguín, L.M., Morales, F. y Valdéz, V., *Phytochemistry*, 13, 2617 (1974).
- Douglas, A.G. y Eglinton, G., citado por Swain, T. en *Comparative Phytochemistry*, p. 55. Academic Press, London. 1965.
- Duerden, A., Heilbron, I.M., Mc Meeking, W. y Spring, F.S., *J. Chem. Soc.*, 322 (1939).
- Dupont, G. y Julia, M., *Bull. Soc. Chim. France*, 1071 (1947).
- Eglinton, G. y Hamilton, R.J., citado por Swain, T. en *Chemical Plant Taxonomy*, p. 187. Academic Press, London. 1963.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., Kelly, W.B. y Reed, R.I., *Phytochemistry* 5, 1349 (1966).
- Eglinton, G. y Hamilton, R.J., *Science*, 156, 1322 (1967).
- Elber, R., Weiss, E. y Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, 52, 2583 (1969)
- Elsevier's Encyclopaedia of Organic Chemistry*, Radt, F. Ed. Springer-Verlag, Berlín. 1959.
- Engler, A., *Syllabus der Pflanzenfamilien*, Gebrüder-Borntraeger, Berlín. 1944.
- Eschenmoser, A., Ruzicka, L., Jeger, O. y Arigoni, D., *Helv. Chim. Acta*, 38, 1890 (1955).
- Espejo, V.A., *Boletín Oficial de la Exposición Nacional de Córdoba*, 7, 63 (1871).
- Estrada, H., *Bol. Inst. Quím. Univ. Nac. Auton. Mex.*, 8, 45 (1956).
- Farmer, R.H. y Campbell, W.G., *Nature*, 165, 237 (1950).
- Fieser, L.F., Golab, T. Jäger, H. y Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, 43, 102 (1960).

- Fischer, F. y Arlt, W., Chem. Ber., 97, 1910 (1964).
- Fourie, T.G., Praez, I.C. y Roux, D.G., Phytochemistry, 11, 1763 (1972).
- Fukui, K. y Fujimoto, H., Tetrahedron Lett., 4303 (1965).
- Gage, T.B. y Wender, S.H., Anal. Chem. 22, 708 (1950).
- Geissman, T.A. y Clinton, R.O., J. Am. Chem. Soc., 68, 697 (1946).
- Geissman, T.A. y Hinreiner, E., Botan. Rev., 18, 77 (1952).
- Geissman, T.A., Harborne, J.B. Seikel, M.K., J. Am. Chem. Soc., 78, 825 (1956).
- Geissman, T.A., Ed., The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press, London. 1962.
- Geissman, T.A. y Crout, D.H.G., Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism, Cap. 5, Freeman, Cooper Co., San Francisco. 1969.
- Gellért, E., Hamet, R. y Schlittler, E., Helv. Chim. Acta, 34, 642 (1951)
- Gellért, E., Govindachari, R.T., Lakshmikantham, M.V., Ragade, I.S. Rudzats, R. y Viswanathan, N., J. Chem. Soc., 1008 (1962).
- Gellért, E. y Summons, R.E., Aust. J. Chem., 26, 1835 (1973).
- Gonnet, J.F., Kozjek, F. y Favre-Bonvin, J., Phytochemistry, 12, 2773 (1973).
- González, A.G. y Mora, M.L.G., Anal. Real Soc. Esp. Fis. Quím., 48B 475 (1952).
- González, A.G., Bretón, J.L. y Fraga, B.M., Rev. Latinoamer. Quím., 2, 167 (1971).
- Good, R., Features of Evolution in the Flowering Plants. Cap. 7 y 8. Lonmans, Green y Co. London. 1956.

- Göschke, R., Weiss, E. y Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, 44, 1031 (1961).
- Govindachari, T.R., Lakshmikantham, M.V., Pai, B.R. y Rajappa, S., *Tetrahedron*, 9, 53 (1960 a).
- Govindachari, T.R., Pai, B.R., Ragade, I.S., Rajappa, S. y Viswanathan, N., *Chem. Ind.*, 966 (1960 b).
- Grisebach, H., *Z. Naturforsch.*, 12 b, 227 (1957).
- Grisebach, H., *Z. Naturforsch.*, 14 b, 802 (1959).
- Grisebach, H. y Doerr, N., *Z. Naturforsch.*, 15 b, 284 (1959).
- Grisebach, H. y Patschke, L., *Chem. Ber.*, 93, 2326 (1960).
- Grisebach, H. y Brandner, G., *Z. Naturforsch.*, 16 b, 2 (1961).
- Grisebach, H. y Patschke, L., *Z. Naturforsch.*, 16 b, 645 (1961).
- Grisebach, H., *Planta Med.*, 10, 385 (1962).
- Grisebach, H. y Brandner, G., *Experientia*, 18, 400 (1962).
- Grisebach, H. y Barz, W., *Z. Naturforsch.*, 18 b, 466 (1963).
- Grisebach, H. y Barz, W., *Z. Naturforsch.*, 19 b, 569 (1964 a).
- Grisebach, H. y Barz, W., *Chem. Ber.*, 97, 1688 (1964 b).
- Grisebach, H. citado por Goodwin, T.W. en *Chemistry and Biochemistry in Plant Pigments*, p. 279. Academic Press, London. 1965).
- Grisebach, H. y Kellner, S., *Z. Naturforsch.*, 20 b, 446 (1965).
- Grisebach, H. y Bilhuber, W., *Z. Naturforsch.*, 22 b, 146 (1967).
- Grisebach, H., *Biosynthetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants*. John Wiley y Sons, Inc. New York. 1967.
- Grisebach, H. y Barz, W., *Naturwiss.*, 56, 538 (1969).

- Halsall, T.G., Jones, E.R.H. y Meakins, G.D., J. Chem. Soc., 2862 (1952).
- Hantzschel, G., Beiträge zur Pharmacognosie der Morrenia brachystephana, Gr., Inaug. Dis. Erlangen, 1895; tomado de Bull. Thérapeutique, 158, 914 (1910).
- Harborne, J.B., J. Chromatog., 1, 473 (1958).
- Harborne, J.B., J. Chromatog., 2, 581 (1959).
- Harborne, J.B., en The Chemistry of Flavonoid Compounds, Geissman, T.A., Ed., Pergamon Press, Oxford, p. 593 (1962).
- Harborne, J.B., Comparative Biochemistry of the Flavonoids, p. 267, Academic Press, London. 1967.
- Harborne, J.B., citado por Swain, T. en Comparative Phytochemistry, p. 271, Academic Press, London, 1966.
- Harborne, J.B., Recent Advances in Phytochemistry, vol. IV, p. 107, Runeckles, V.C. y Watkin, J.E., Eds., Appleton Century-Crofts, Nueva York, 1972.
- Harborne, J.B., Phytochemistry, 12, 1085 (1973).
- Harborne, J.B., Phytochemistry, 14, 1147 (1975).
- Hassal, C.H. y Reyle, K., Chem. Ind. 487 (1956).
- Hassal, C.H., J. Chem. Soc. 85 (1959).
- Hattori, S. y Matsuda, H., J. Am. Chem. Soc., 76, 5792 (1954).
- Hayano, M., Gut, M., Dorfman, R.I., Sebek, O.K. y Peterson, D.H., J. Am. Chem. Soc., 80, 2336 (1958).
- Hegnauer, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, tomo III, Birkhäuser Verlag, Basel. 1964.

- Herbin, G.A. y Robins, P.A., *Phytochemistry*, 7, 257 (1968 a).
- Herbin, G.A. y Robins, P.A., *Phytochemistry*, 7, 1325 (1968 b).
- Herbin, G.A. y Robins, P.A., *Phytochemistry*, 8, 1985 (1969).
- Hesse, G., Eilbracht, H. y Reichender, F., *Ann. Chem.*, 546, 233 (1941)
- Hemmert, F., Lacoume, B., Levisalles, J. y Petit, G., *Bull. Soc. Chim.(France)*, 776 (1966 a).
- Hemmert, F., Leblache-Combier, A., Lacoume, B., Levisalles, J.,
Bull. Soc. Chim. (France), 982 (1966 b).
- Hieronymus, J., *Plantas Diafóricas. Flora Argentina*, p. 189 (1882),
tomado de una reedición de Ed. Atlántida, 1940.
- Horhämmer, L. y Hänsel, R., *Arch. Pharm.*, 285, 438 (1952).
- Horhämmer, L., Wagner, H., Graf, E. y Farkas, L., *Chem. Ber.*, 98,
548 (1965).
- Horhämmer, L., Wagner, H., Arndt, H.G. y Farkas, L., *Chem. Ber.*, 99,
1384 (1966).
- Horhämmer, L., Wagner, H., Arndt, H.G., Dirscherl, R. y Farkas, L.,
Chem. Ber., 101, 450 (1968).
- Horn, D.H.S., Kranz, Z.H. y Lamberton, J.A., *Aust. J. Chem.*, 17,
464 (1964).
- House, H.O., Reif, D.J. y Wasson, R.L., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2490
(1957).
- Ireland, R.E., Baldwin, S.W., Dawson, D.J., Dawson, M.I., Dolfini,
J.E., Newbould, J., Johnson, W.S., Brown, M., Crawford, R.J.,
Hudrlik, P.F., Rasmussen, G.H. y Schmiegel, K.K., *J. Am. Chem.
Soc.*, 92, 5743 (1970).

- Ito, S., Kadama, M., Sunagawa, M., Oba, T. e Hikino, H., *Tetrahedron Lett.*, 2905 (1969).
- Jäggi, K., Kaufmann, H., Stöcklin, W. y Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta*, 50, 2457 (1967).
- Javarone, C., Piancatelli, G., Mincione, E. y Nicita, G., *Gazz. Chim. Ital.*, 100, 888 (1970).
- Jurd, L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 376 (1956).
- Jurd, L. y Geismann, T.A., *J. Org. Chem.*, 21, 1395 (1956).
- Jurd, L. y Horowitz, R.M., *J. Org. Chem.*, 22, 1618 (1957).
- Kamienski, E. von, *Planta*, 50, 291 (1957).
- Kaneda, T., *Biochem.* 6, 2023 (1967).
- Kaneda, T., *Biochem.* 7, 1194 (1968).
- Karrer, W., *Konstitution und Vorkommen der Organische Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag-Basel und Stuttgart. 1958.
- Keeton, J.F. y Keogh, M., *Phytochemistry*, 14, 290 (1975).
- Kern, W. y Haselbeck, H., *Arch. Pharm.*, 283, 102 (1950).
- Khastgir, H.N. y Pradham, B.P., *J. Indian Chem. Soc.*, 44, 159 (1967).
- Klein, G. Ed., *Handbuch der Pflanzenanalyse*, tomo I, Springer-Verlag, Viena. 1931.
- Knights, B.A., *J. Gas Chromatography*, 5, 273 (1967).
- Koeppen, B.H. y Roux, D.G., *Biochem. J.*, 97, 444 (1965).
- Kolattukudy, P.E., *Biochem.*, 4, 1844 (1965).
- Kolattukudy, P.E., *Biochem.*, 5, 2265 (1966).
- Kolattukudy, P.E., *Phytochemistry*, 6, 963 (1967).

- Lehn, J.M. y Ourisson, G., Bull. Soc. Chim. (France), 1137 (1962).
- Lindley, V., Veg. Kind., 623 (1847), citado por Meyer, T. (1944).
- Lowry, J.B., Phytochemistry, 7, 1897 (1968).
- Mabry, T.J., Kagan, J. y Rösler, H., Phytochemistry, 4, 487 (1965).
- Mabry, T.J., Markham, K.R. y Thomas, M.B., The Systematic
Identification of Flavonoids, Springer Verlag. Nueva York. 1970.
- Mahesh, V.B. y Seshadri, T.R., J. Chem. Soc., 2504 (1955).
- Mansfield, G.H., Swain, T. y Nördstrom, C.G., Nature, 172, 23 (1953).
- Marion, L., Canad. J. Research, B 17, 21 (1939).
- Markham, K.R. y Mabry, T.J., Phytochemistry, 7, 1197 (1968).
- Melchior, H., citado por Engler, A. en Syllabus der Pflanzenfamilien,
tomo II, p. 414, Gebrüder-Borntraeger. Berlín. 1964.
- Meyer, T. en Genera et Specie Plantarum Argentinarum, Descole, H.R.
tomo II, Guillermo Kraft, Buenos Aires. 1944.
- Mold, J.D., Stevens, R.K., Means, R.E. y Ruth, J.M., Biochem., 2, 605
(1963).
- Montuori, E. y Ceñal, E.E., Departamento de Investigación, Laborato-
rios Dr. Gador y Cía., comunicación personal. (1974).
- Müller, H., J. Chem. Soc., 107, 872 (1914).
- Nakamura, H., Ohta, T. y Hukuti, G., J. Pharmacol. Soc. Japan, 56,
107 (1936). C.A., 32, 5833^{3,4}.
- Nakaoki, T., Morita, N. e Isetani, A., Yakugaku Zasshi, 81, 558 (1961)
- Narasimbachari, N. y Seshadri, T.R., Proc. Indian Acad. Sci., 30A, 151
(1949). C.A., 45, 10243a.

- Nishioka, I., Ikekawa, N., Yagi, A., Kawasaki, T. y Tsukamoto, T.,
Chem. Pharm. Bull. (Japan), 13, 379 (1965). C.A., 61, 14769d.
- Nördstrom, C.G. y Swain, T., J. Chem. Soc., 2769 (1953).
- Ortiz, A.D., Las mamas y el tasi argentino. Su propiedad lactígena.
Tesis. Buenos Aires. 1880.
- Patschke, L., Barz, W. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 19b, 1110
(1964).
- Patschke, L. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 20b, 399 (1965).
- Patschke, L., Barz, W. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 21b, 45
(1966 a).
- Patschke, L., Barz, W. y Grisebach, H., Z. Naturforsch., 21b, 201
(1966 b).
- Partridge, S.M., Nature, 164, 443 (1949).
- Perkin, A.G., J. Chem. Soc., 69, 206 (1896).
- Perrot, P. y Chevalier, J., Bull. Thérapeutique, 158, 913 (1910).
- Piatlak, D.M. y Eichmeier, L.S., Phytochemistry, 11, 436 (1972).
- Porter, L.J. y Markham, K.R., Phytochemistry, 9, 1363 (1970).
- Purdie, S.J. y Truter, E.V., Nature, 190, 554 (1961).
- Radler, F. y Horn, D.H.S., Aust. J. Chem., 18, 1059 (1965).
- Raffauf, R.F., A Handbook of Alkaloids and alkaloid containing
plants. Wiley Interscience, Nueva York. 1970.
- Rama Murti, P.B. y Seshadri, T.R., Proc. Indian Acad. Sci., 14A, 93
(1941).
- Rama Murti, P.B. y Seshadri, T.R., Proc. Indian Acad. Sci., 20A,
266 (1944).

- Rathmell, W.G. y Bendall, D.S., Proc. Phytochem. Soc., Dublin, 1971,
of. Phytochemistry, 11, 873 (1972).
- Rees, H.H. y Goodwin, T.W. en Biosynthesis, vol. I, p. 59. The Chemical
Society. 1972.
- Reichstein, P., Kaufmann, H., Stöcklin, W. y Reichstein, T., Helv.
Chim. Acta, 50, 2114 (1967).
- Rosenheim, O., Biochem. J., 14, 178 (1920).
- Ruzicka, L., Geza Müller y Schellenberg, Helv. Chim. Acta, 22, 767
(1939).
- Ruzicka, L. y Jeger, O., Helv. Chim. Acta, 24, 1236 (1941).
- Ruzicka, L. y Jeger, O., Helv. Chim. Acta, 25, 457 (1942).
- Ruzicka, L., Experientia, 9, 357, 362 (1953).
- Sando, Ch. E. y Bartlett, H.H., J. Biol. Chem., 54, 636 (1922).
- Saner, A., Zerlentis, C., Stöcklin, W. y Reichstein, T., Helv. Chim.
Acta, 53, 221 (1970).
- Sendra, J., Seidl, O., Miedzobrodzka, J. y Zieba, J., Diss. Pharm.
Pharmacol., 21, 185 (1969).
- Schmid, W., Uehlinger, H.P., Tamm, Ch. y Reichstein, T., Helv. Chim.
Acta, 42, 72 (1959).
- Schumann, K. en Die natürlichen Pflanzenfamilien, tomo IV, p. 189,
Engler, A. y Prandtl, K. Ed. Leipzig. 1895.
- Seo, S., Tomita, Y. y Tori, K., Chem. Commun., 270 (1975).
- Shamma, M., Glick, R.E. y Mumma, R.O., J. Org. Chem., 27, 4512 (1962).

- Shaw, G. y Yeadown, A., J. Chem. Soc., 16 (1966).
- Shimokoriyama, M. y Hattori, S., J. Am. Chem. Soc., 75, 1900 (1953a).
- Shimokoriyama, M. y Hattori, S., J. Am. Chem. Soc., 75, 2277 (1953b).
- Shimokoriyama, M., J. Am. Chem. Soc., 79, 214 (1957).
- Shimokoriyama, M. en The Chemistry of Flavonoid Compounds, p. 286,
Geissman, T.A. Ed. Pergamon Press, Oxford. 1962.
- Sicardi, J., Estudios sobre el tasi argentino. Tesis. Buenos Aires.
(1892).
- Sierp, D., Stöcklin, W. y Reichstein, T., Helv. Chim. Acta, 53, 27
(1970).
- Simpson, J.C.E., J. Chem. Soc., 283 (1944).
- Skarzynski, B., Biochem. Z., 301, 150 (1939).
- Sörm, F., Wollrab, V., Jarolinek, P. y Streibl, M., Chem. Ind.
1833 (1964).
- Steele, J.A. y Mossetig, E., J. Org. Chem., 28, 571 (1963).
- Stöcklin, W., Helv. Chim. Acta, 51, 1235 (1968).
- Stöcklin, W., Helv. Chim. Acta, 52, 365 (1969).
- Styles, E.D. y Ceska, O., Phytochemistry, 11, 3019 (1972).
- Swain, T. y Williams, G.A., Phytochemistry, 9, 2115 (1970).
- Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. y Wells, W.W., J. Am. Chem.
Soc., 85, 2497 (1963).
- Tai, H.H. y Bloch, K., J. Biol. Chem., 247, 3767 (1972).
- Takemoto, T., Kusano, G. y Hikino, H., Yakugaku Zasshi, 86, 1160
(1966).

- Thompson, R.S., Jacques, D., Haslam, E. y Tanner, R.J.N., J.C.S. Perkin I, 1387 (1972).
- Tira, S., Galeffi, C., Miranda delle Monache, E., Ann. Chim. (Rome) 59, 284 (1969).
- Tominaga, T., J. Pharm. Soc. Japan, 78, 1077 (1958).
- Torrance, J.D. y Marais, J.L.C., J. Pharm. Sci. 52, 439 (1963).
- Tursch, B., Savoir, R., Ottinger, P. y Chiordoglu, G., Tetrahedron Lett., 34, 539 (1967).
- van Tamelen, E.E., Accounts Chem. Res., 1, 111 (1968).
- Vogel, A.I., Practical Organic Chemistry. Longmans, Londres. 1966.
- Waiss, A.C., Lundin, R.E. y Stern, D.J., Tetrahedron Lett. 513 (1964).
- Walton, E. y Butt, V.S., Phytochemistry, 10, 295 (1971).
- Warburton, W.K., Quart. Rev. (London), 8, 68 (1954).
- Weinges, K., Bähr, W., Ebert, W., Göritz, K. y Marx, H.D., Fortsch. Chem. Org. Naturstoffe, 27, 158 (1969).
- Whalley, W.B., Chem. Ind., 1049 (1956).
- Whalley, W.B. en The Chemistry of Flavonoid Compounds, Geissman, T.A. Ed. Pergamon Press, Londres. p. 452 (1962).
- White, J.W. y Senti, F.R., J. Am. Chem. Soc., 67, 881 (1945).
- Wiegrebe, W., Faber, L., Brockman, H., Budzikiewicz, H. y Krüger, U., Ann. Chem., 721, 154 (1969).
- Wong, E. y Moustafa, E., Tetrahedron Lett., 26, 3021 (1966).
- Wong, E., Phytochemistry, 5, 463 (1966 a).
- Wong, E., Chem. Ind., 598 (1966 b).

Blaney

Wong

